

***UNA NUEVA HIPÓTESIS PARA EXPLICAR LOS EFECTOS
NEUROSECRETORES DE OUABAÍNA EN CÉLULAS CROMAFINES
QUE IMPLICA AL CALCIO DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO***

MEMORIA DE LA TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

Juan Milla Herrero

Director: Antonio García García

Madrid, noviembre de 2009

LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

2-APB	Borato de 2-aminoetoxidifenilo
100K⁺	Solución extracelular con 100 mM K ⁺
35K⁺	Solución extracelular con 35 mM K ⁺
ACh	Acetilcolina (del inglés <i>Acetylcholine</i>)
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Difosfato de adenosina (del inglés <i>Adenosine diphosphate</i>)
AM	Acetoximetil éster
ATP	Trifosfato de adenosina (del inglés <i>Adenosine triphosphate</i>)
Ba²⁺	Ion bario
Ca²⁺	Ion calcio
[Ca²⁺]_c	Concentración citosólica de calcio
[Ca²⁺]_{RE}	Concentración de calcio en el retículo endoplásmico
CAF	Cafeína
CCB	Células cromafines bovinas
CCDV	Canales de calcio dependientes de voltaje
CICR	Liberación de calcio inducida por calcio (del inglés <i>Calcium Induced Calcium Release</i>)
DAG	Diacylglicerol
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (de inglés <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DNasa	Desoxirribonucleasa
EGFP	Proteína Fluorescente Verde Mejorada (del inglés <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>)

E_m	Potencial de membrana en reposo
ERK1/2	Cinasas reguladas por señal extracelular (del inglés <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>)
Fig.	Figura
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)-N'-piperacinoetanosulfónico
His	Histamina
I_{max}	Amplitud máxima de la espiga amperométrica
IP₃	Inositol trifosfato
IP₃R	Receptor de inositol trifosfato
K⁺	Ion potasio
[K⁺]	Concentración de potasio
m	Pendiente de ascenso de la espiga amperométrica
MAP	Proteínas activadas por mitógeno (del inglés <i>Mitogen Activated Proteins</i>)
nAChR	Receptor nicotínico para acetilcolina (del inglés <i>nicotinic acetylcholine receptor</i>)
[Na⁺]_c	Concentración citosólica de sodio
[Na⁺]_e	Concentración extracelular de sodio
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ de la membrana plasmática (del inglés <i>Sodium Calcium Exchanger</i>)
NKA	Bomba sodio-potasio ATPasa
NPY	Neuropéptido Y
OUB	Ouabaína
PIP₂	Fosfatidilinositol bisfosfato (del inglés <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>)
PKC	Proteína cinasa C (del inglés <i>Protein Kinase C</i>)

PLC	Fosfolipasa C (del inglés <i>Phospholipase C</i>)
Q	Área bajo la curva de la espiga amperométrica que indica la cantidad total de catecolaminas liberadas
RE	Retículo endoplásmico
Ry	Rianodina (del inglés <i>Ryanodine</i>)
RyR	Receptores de rianodina (del inglés <i>Ryanodine receptors</i>)
SBF	Suero Bovino Fetal
SERCA	Bomba de calcio dependiente de ATP del retículo sarco/endoplásmico o Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico (del inglés <i>Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase</i>).
SNC	Sistema nervioso central
SOCE	Entrada de calcio operada por depósito (del inglés <i>Store Operated Calcium Entry</i>)
t_{1/2}	Anchura de la espiga amperométrica a la mitad de su altura
TAPSI	Tapsigargina
TRPC	Receptores de potencial transitorio para cationes (del inglés <i>Transient Receptor Potential Cation</i>)
UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Marco en el que se desarrolla esta Tesis Doctoral.....	3
1.2.- Introducción.....	5
1.2.1.- Glucósidos cardiotónicos y ouabaína: ligandos naturales de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa que potencian la exocitosis.....	5
1.2.1.1.- <i>Perspectiva histórica de la ouabaína: de veneno a neuroesteroide.....</i>	6
1.2.1.2.- <i>La bomba sodio-potasio ATPasa.....</i>	9
1.2.1.3.- <i>Mecanismos de acción de los glucosidos cardiotónicos.....</i>	12
1.2.1.4.- <i>Acciones a nivel orgánico de los esteroides cardiotónicos: perspectivas terapéuticas.....</i>	16
1.2.2.- La célula cromafín: modelo de estudio de la neurosecreción.....	18
1.2.2.1.- <i>El proceso exocitótico en la célula cromafín bovina.....</i>	18
1.2.2.1.1.- <i>Receptores nicotínicos para acetilcolina.....</i>	20
1.2.2.1.2.- <i>Canales de calcio dependientes de voltaje.....</i>	20
1.2.2.1.3.- <i>El retículo endoplásmico.....</i>	22
1.2.2.1.4.- <i>Control de la secreción por organelas intracelulares: La tríada funcional, NCX y SOCE.....</i>	25
1.2.2.1.5.- <i>Las vesículas exocitóticas: procesos de maduración y transporte.....</i>	27
II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	31
III.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1.- Aislamiento y cultivo de células cromafines bovinas.....	39
3.2.- Medida en tiempo real de la liberación de catecolaminas de poblaciones de células cromafines bovinas.....	39
3.3.- Medida del potencial de membrana mediante la técnica de patch-clamp en la modalidad de parche perforado.....	40
3.4.- Registro amperométrico de la liberación cuantál de catecolaminas en células individualizadas.....	41
3.5.- Medida de I_{Ba} mediante la técnica de patch-clamp en la modalidad de célula entera.....	41

3.6.- Medida de $[Ca^{2+}]_c$ mediante la sonda fluorescente Fluo-4.....	42
3.7.- Medida de $[Ca^{2+}]_{RE}$ en células cromafines bovinas transfectadas con camaleón-D1.....	42
3.8.- Medida de la movilidad vesicular mediante la técnica de TIRFM.....	43
3.9.- Seguimiento de la internalización de ouabaína fluorescente utilizando microscopía confocal.....	44
3.10.- Materiales y soluciones.....	45
3.11.- Análisis de los datos.....	45

IV. RESULTADOS..... 49

4.1.- Efecto de ouabaína 10 μM sobre la exocitosis estimulada con pulsos de 35 mM K^+ (35K⁺).....	51
4.1.1.- Caracterización del efecto de ouabaína sobre las respuestas secretoras inducidas por 35 K^+	51
4.1.1.1.- <i>Estudio de la potenciación ouabaínica mediante amperometría en poblaciones.....</i>	51
4.1.1.2.- <i>Estudio de la potenciación ouabaínica mediante amperometría en célula única.....</i>	54
4.1.2.- Efecto de ouabaína sobre el potencial de membrana en reposo y despolarización inducida por pulsos de K^+	55
4.1.3.- Efecto de los bloqueantes de canales de calcio en la potenciación por ouabaína de la secreción inducida por pulsos de K^+	57
4.1.4.- Efecto de KB-R7943 en la potenciación por ouabaína de la secreción inducida pulsos de K^+	58
4.1.5.- Efecto de tapsigargina, 2-APB y cafeína en potenciación por ouabaína de la secreción inducida por pulsos de 35K ⁺	59
4.1.6.- Efecto de queleritrina sobre la potenciación por ouabaína de la secreción inducida por pulsos de K^+	63
4.2.- Efecto de ouabaína sobre la exocitosis estimulada por salida de Ca^{2+} reticular con cafeína e histamina.....	64
4.2.1.- Extinción de la respuesta secretora con pulsos repetidos de cafeína e histamina. Efecto regenerador de ouabaína.....	64

4.2.2.- Estudio del mecanismo de acción de la recuperación de la respuesta exocitótica a histamina inducida por ouabaína.....	65
4.3.- Efecto de ouabaína sobre las respuestas secretoras inducidas por pulsos de calcio.....	67
4.3.1.- Caracterización de la respuesta a pulsos de calcio.....	67
4.3.2.- Potenciación de la respuesta secretora a pulsos de Ca^{2+} inducida por ouabaína.....	68
4.3.3.- Participación de los canales L, N y P/Q sobre la potenciación por ouabaína de la secreción inducida por pulsos de Ca^{2+}	69
4.3.4.- Efecto del vaciado farmacológico del RE sobre la potenciación por ouabaína de la secreción inducida por pulsos de Ca^{2+}	70
4.4.- Efecto de ouabaína sobre la exocitosis estimulada con pulsos de ACh.....	71
4.5.- Liberación de Ca^{2+} reticular por aplicación de histamina y ouabaína en CCB transfectadas con camaleón-D1.....	73
4.6.- Estudio de movilidad vesicular mediante la técnica de TIRFM.....	74
4.7.- Internalización de ouabaína-fluoresceína.....	77
V. DISCUSIÓN.....	81
VI. CONCLUSIONES.....	91
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	97

I. Introducción

No hay mayor riqueza que el conocimiento, ni mayor pobreza que la ignorancia
Ali' Iba Abi Talib

1.1.- Marco en que se ha desarrollado esta tesis doctoral

El presente trabajo se enmarca dentro del proyecto “Señales de calcio y exocitosis de neurotransmisores” y versa sobre el estudio de los mecanismos de comunicación celular, que se desarrolla hace más de 30 años en el Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento (ITH) de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

Trabajos previos de nuestro laboratorio han confirmado el papel potenciador del glucósido cardiotónico ouabaína sobre la exocitosis de catecolaminas en la médula adrenal. A la luz de varios trabajos en esta materia, se ha postulado que la inhibición del transporte activo Na^+/K^+ por ouabaína, mediante una discreta elevación de la concentración citosólica de calcio, $[\text{Ca}^{2+}]_c$, es un factor determinante de este aumento en la secreción de catecolaminas.

Esta tesis plantea como objetivo principal el estudio detallado de la homeostasia del Ca^{2+} intracelular y las principales estructuras que lo controlan en el fenómeno de potenciación de la neurosecreción inducido por ouabaína. Así, pretendemos obtener más datos que clarifiquen el complejo mecanismo de la exocitosis de neurotransmisores.

A lo largo de los últimos años, se ha profundizado ampliamente en los procesos de señalización dependientes de Ca^{2+} intracelular. En concreto, el grupo del Profesor Antonio García García ha conseguido relacionar con éxito distintos subtipos de canales de Ca^{2+} voltaje-dependiente con la exocitosis y describir mecanismos de control de la neurosecreción, tanto potenciadores (p.ej. activación de la PKC) como inhibidores (p.ej. modulación autocrina por ATP y opioides). En colaboración con el grupo del Doctor Javier García Sancho, se ha elaborado la teoría de la tríada funcional, que, en adición a los canales de calcio de membrana, implica directamente a las organelas intracelulares retículo endoplásmico y mitocondria en la gestión de microdominios de Ca^{2+} intracelular que controlan distintas etapas de la exocitosis.

Si bien éste es un trabajo de Farmacología Básica, nuestro estudio tiene también una vertiente práctica y clínica, ya que la ouabaína es una sustancia de producción endógena en la corteza adrenal de mamíferos. Las células cromafines de la médula adrenal, además de un excelente modelo de neurotransmisión similar a las neuronas simpáticas, son células diana para la acción de éste fármaco, ya considerado por algunos como hormona esteroidea. Las funciones fisiológicas atribuidas a la ouabaína están relacionadas con la hipertensión arterial, el ejercicio y la hipoxia y se han logrado sorprendentes resultados en modelos animales de hipertensión. El control de la secreción de catecolaminas es en sí mismo un importante factor en la regulación de la hipertensión arterial.

Antes de exponer en detalle los objetivos y protocolos experimentales de esta tesis doctoral, es necesario analizar el conocimiento actual sobre la bomba Na^+/K^+ -ATPasa y el mecanismo de acción de los glucósidos cardiotónicos, así como describir aquellas estructuras que participan en el proceso secretor y la entrada y redistribución de calcio en la célula cromafín bovina, que constituye nuestro modelo experimental.

1.2.- Introducción

1.2.1.- Glucósidos cardiotónicos y ouabaína: ligandos naturales de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa que potencian la exocitosis.

Se conoce como glucósidos cardiotónicos a un grupo de sustancias esteroideas con actividad inotrópica positiva sobre el músculo cardíaco. Se les conoce también como digitálicos, ya que están representados por la digoxina, obtenida de las semillas y hojas del género *Digitalis*. La ouabaína, también conocida como g-estrofantina, es también un esteroide cardiotónico con propiedades farmacológicas similares a la digoxina.

La ouabaína, entre otras propiedades que serán revisadas más adelante, aumenta la **síntesis y secreción de neurotransmisores** en multitud de modelos de neurotransmisión. Por ejemplo, inducen la liberación de acetilcolina en la placa motora de rata (Elmqvist y Feldman, 1965), rana (Baker y Crawford, 1975; Birks y Cohen, 1968a, 1968b) y sapo (Balnave y Gage, 1974) así como en las terminaciones parasimpáticas de cobaya (Paton et al., 1971) y rodajas de cerebro de rata (Vizi, 1972). También aumentan la liberación espontánea de catecolaminas en la glándula suprarrenal bovina (Banks, 1967), conducto deferente de cobaya (Ozawa y Kasuragi, 1974), corazón de conejo (Lindmar y Loffelholz, 1974), rodajas de bazo de gato (García y Kirpekar, 1973a, 1973b), glándula suprarrenal de gato, cobaya y rata (García et al., 1980; Wakade, 1981), tejido humano atrial (Haass et al., 1997) y células cromafines bovinas en cultivo (Aunis y García, 1981; Haass et al., 1997).

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio sobre el efecto de ouabaína en la neurosecreción en glándula adrenal y cultivos de células cromafines bovinas (CCB) muestran un notable efecto potenciador sobre la secreción espontánea de catecolaminas y también de la inducida por soluciones con K^+ elevado. El grado de unión de ouabaína a la bomba Na^+/K^+ -ATPasa se correlaciona con la liberación de catecolaminas y DBH, indicando que el mecanismo de liberación es exocitótico. Los efectos potenciadores son

específicos para la ouabaína y no ocurren utilizando otros inhibidores del transporte Na^+/K^+ , como la N-etilmaleimida, el vanadato o la fenoxibenzamina (García y col., 1980; Aunis y García, 1981). En estos trabajos se postula una implicación del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y/o de las organelas intracelulares en el efecto potenciador de ouabaína. El papel del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ha sido también sugerido por otros autores como necesario para la potenciación de la exocitosis en CCB (Torok y Powis, 1990), si bien la posible participación del Ca^{2+} intracelular queda por determinar. Asimismo, la liberación de catecolaminas utilizando reintroducción de Ca^{2+} es fuertemente potenciada por ouabaína en glándula adrenal intacta en un proceso dependiente de la concentración extracelular de Na^+ , $[\text{Na}^+]_e$ (Esquerro y col., 1980).

Por último, en cultivos de células cromafines bovinas tratados con ouabaína, se ha detectado un ligero incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ que se desarrolla gradualmente a lo largo de 1 hora (de la Fuente y col., 1996). Si bien este aumento es insuficiente para generar una respuesta exocitótica notoria, puede promover la movilización y maduración de las vesículas (Neher, 1998), aumentando la cantidad de vesículas listas para ser exocitadas en la submembrana. Ello podría explicar la mayor respuesta exocitótica generada por estímulos despolarizantes en células cromafines tratadas con ouabaína.

Como revisaremos a continuación, las teorías sobre el mecanismo de acción de los digitálicos como agentes inotrópicos sobre el músculo cardíaco han evolucionado en las últimas décadas. Sin embargo, aún no se dispone de un modelo completo para explicar sus efectos en el sistema neuroendocrino.

1.2.1.1.- Perspectiva histórica de la ouabaína: de veneno a neuroesteroide

Las propiedades farmacoterápicas de los digitálicos fueron descritas por primera vez en el siglo XVIII por William Withering (Fig. 1), quien encontró que los extractos de *Digitalis Purpurea* eran de utilidad en el tratamiento “de la hidropesía y otros trastornos” (Withering, 1785). Sin embargo éste no ha sido el primer uso que los humanos hemos encontrado para estas sustancias: estudios paleontológicos confirman que los extractos de la planta del ouabaio (*Strophantus gratus*) ya eran usados hace milenios por los aborígenes africanos como veneno para la caza. La medicina

tradicional china cuenta asimismo con varios ejemplos del uso terapéutico de esteroides estructuralmente emparentados con los digitálicos, si bien en su caso la fuente de obtención eran venenos de sapo (*Bufo bufo*). Los médicos musulmanes de la España del siglo VIII también conocían y utilizaban los extractos de digital (Brewer, 2004)



Fig. 1.- William Withering (1741-1799)

La potencia de estos fármacos es sobresaliente. En el siglo XIX, Ringer postuló la existencia de sustancias endógenas similares a los digitálicos que mimetizarían las acciones de éstos de forma fisiológica (Ringer, 1885). Esta idea fue recogida por científicos de mediados del siglo XX (Szent-Györgyi, 1951), momento en el que se describe el transporte de iones Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática del eritrocito y se describe la acción farmacológica de los glucósidos cardiotónicos (Schatzman, 1953). Desde entonces, se han realizado múltiples avances en el conocimiento del mecanismo de acción de los digitálicos que serán revisados más adelante.

La teoría sobre la existencia de digitálicos endógenos ha resultado ser cierta. Si bien ya se había encontrado actividad endógena “de tipo digitálico” en mamíferos (Fishman, 1979), no fue hasta 1991 cuando se identificaron en plasma humano pequeñas cantidades de un compuesto con propiedades similares a la ouabaína (Hamlyn y col., 1991). La glándula adrenal y el hipotálamo son tejidos ricos en estos compuestos. La misma conclusión se ha obtenido para la especie bovina (Li y col., 1998) y rata (Ferrandi y col., 1993).

La estructura química de la ouabaína (Fig. 2), más propia de vegetales que de animales, hizo cuestionarse la veracidad de estos hallazgos: la ouabaína del plasma podría provenir de la dieta y era improbable su significado fisiológico a concentraciones picomolares (Hansen, 2003). Hoy día se han definido las rutas biosintéticas de ouabaína y sustancias análogas en mamíferos y se ha detectado la presencia de digitálicos en cultivos de células adrenocorticales (Laredo y col., 1994; El-Masri y col., 2002), células cromafines y PC12. Si bien las concentraciones plasmáticas de ouabaína en situación de

reposo rondan el picomolar, en ciertos tejidos cercanos a los lugares de producción endógena se alcanzan concentraciones nanomolares de ouabaína.

La ouabaína se libera fisiológicamente en respuesta al ejercicio físico donde sus acciones inotrópicas cardíacas y presoras son de utilidad. Tras someterse a ejercicio intenso, se han detectado concentraciones de ouabaína plasmáticas en torno a los 200 nM, que son similares a los de otras hormonas esteroideas (Nicholls y col., 2009; Bauer y col., 2005). En la glándula adrenal, esta concentración es unas 500 veces superior a la concentración en plasma (Kölbel y Schreiber, 1996). Así pues, como revisaremos más adelante, la ouabaína cumple los requisitos para ser considerada un neuroesteroide de producción endógena con funciones de hormona a nivel sistémico.

La digoxina y la ouabaína se utilizan en la medicina occidental para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y ciertos tipos de arritmias supraventriculares (Rang y Dale, 2008). El estrecho margen/rango terapéutico y su elevada toxicidad han limitado el uso de estas sustancias en terapéutica. Si bien hoy día se siguen usando preparados comerciales con digoxina, la ouabaína está restringida al uso hospitalario y ha sido desplazada por terapias menos peligrosas.

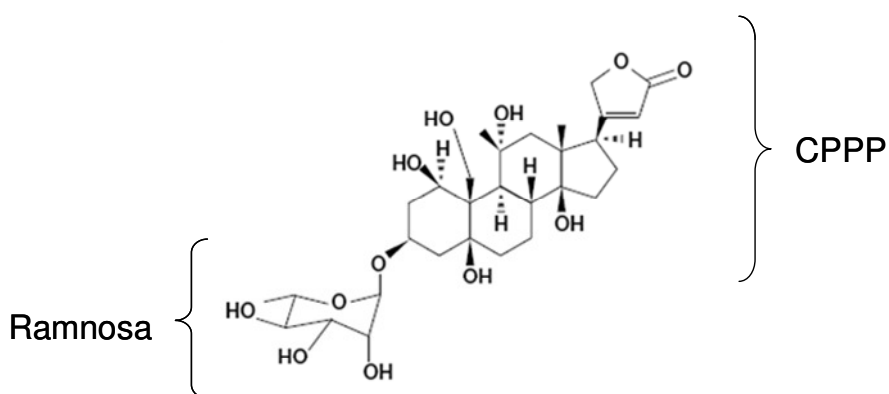


Fig. 2.- Estructura química de la ouabaína según una proyección de Fischer. Los compuestos digitálicos pueden ser clasificados atendiendo a su origen en cardenólidos, presentes en vegetales (p.ej. ouabaína) y bufadenólidos, originalmente encontrados en la piel de sapo (p. ej. bufalina). Todos ellos comparten una estructura básica esteroidea (ciclopentanoperhidrofenantreno, CPPP) unida a una lactona que puede ser pentacíclica (cardenólidos) o hexacíclica (bufadenólidos). Además, los esteroides cardiotónicos pueden estar sustituidos por una o varias hexosas. En el caso de la ouabaína, el sustituyente es el monosacárido ramnosa.

1.2.1.2.- La bomba sodio-potasio ATPasa

Debido a su especial importancia en el estudio que nos planteamos, analizaremos con detalle la **bomba Na^+/K^+ -ATPasa** (NKA, del inglés *Na^+/K^+ -ATPase*) y sus acciones en el organismo, así como la de sus ligandos naturales, los glucósidos cardiotónicos, entre los que se encuentra la ouabaína. Es una proteína integral de membrana presente en virtualmente todos los tipos de células. Lleva a cabo el **transporte de iones Na^+ y K^+** de forma antiparalela a ambos lados de la membrana, sacando Na^+ a la par que introduce K^+ con una estequiometría 1:1. Esta actividad se realiza en contra de gradiente y precisa suministro de energía en forma de ATP. Esta estructura es en buena medida responsable del **mantenimiento del gradiente electroquímico** y, por tanto, del potencial de membrana y es de particular importancia en los procesos de repolarización en células excitables como la célula cromafín. Se ha calculado que su actividad consume aproximadamente un 30% del gasto energético total en humanos. En células excitables, como la célula cromafín y las neuronas, la generación de potenciales de acción provoca considerables cambios en las concentraciones de Na^+ y K^+ intracelulares, que deben ser restablecidas durante la fase de repolarización de la membrana. Se ha calculado que en células excitables la NKA puede consumir hasta un 60% de la energía celular para el mantenimiento del gradiente de iones a ambos lados de la membrana. El gradiente electroquímico se utiliza también para el transporte de solutos y nutrientes esenciales para la supervivencia de la célula (p.ej.: cotransportadores Na^+ /glucosa).

El fenómeno del transporte de Na^+ y K^+ fue descrito por primera vez por Schatzmann en 1953 en membranas de eritrocitos. Poco más tarde, Jens Skou caracterizó la actividad de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa (Skou, 1957). Este y sucesivos trabajos le valieron a Skou el premio Nobel de Química en el año 1997. En estos estudios, se revela la dependencia de Mg^{2+} y se estudian los efectos de distintas concentraciones de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} sobre la actividad de la NKA.

El proceso de transporte iónico se describe en la Fig. 3:

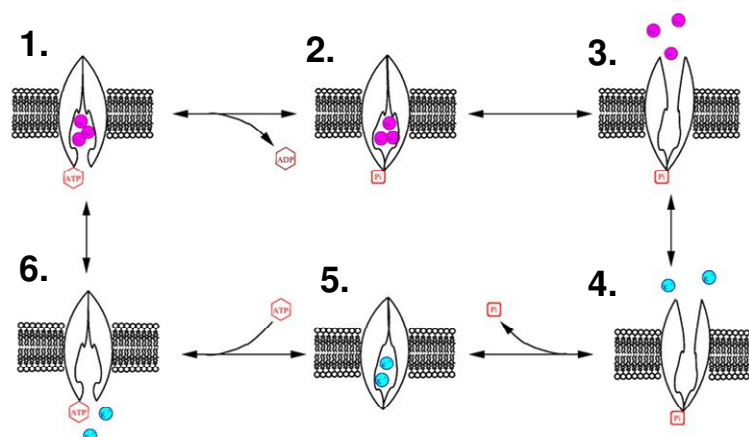


Fig. 3.- Modelo de funcionamiento del transporte activo de Na^+ y K^+ a través de la NKA:

- 1: acoplamiento de tres iones de sodio (3 Na^+) intracelulares al lado intracitoplasmático de la proteína.
- 2: fosforilación de la proteína mediante la hidrólisis de ATP y liberación de difosfato de adenosina (ADP). El grupo fosfato, al unirse a la proteína, provoca un cambio conformacional en la bomba que expone a los átomos de Na^+ al líquido extracelular
- 3: liberación de los 3 Na^+ fuera de la célula.
- 4: dos iones de potasio (2 K^+) extracelulares se acoplan a la proteína de transporte.
- 5: el grupo fosfato se libera de la proteína induciendo el ingreso de los dos átomos de K^+ en la célula.
- 6: liberación de K^+ al interior celular y acoplamiento de una nueva molécula de ATP.

Bioquímicamente, la NKA se clasifica como una ATPasa tipo P (transportadores activos dependientes de ATP) perteneciente a la superfamilia 3.A.3. La proteína es un heterodímero compuesto por dos **subunidades** llamadas α y β . En la subunidad α residen la actividad catalítica y los dominios de unión a sustratos, ATP y Mg^{2+} . En ella se encuentra también el sitio de unión de los digitálicos. La subunidad β está relacionada con los procesos de maduración y ensamblaje a la membrana plasmática (Blanco y Mercer, 1998; Kawamura y Noguchi, 1991). La expresión de subunidades α y β sigue una estequiometría 1:1, siendo necesaria la expresión de ambas para la formación de una proteína funcional. Las distintas isoformas α (α_1 , α_2 y α_3) presentan una distribución tisular diferencial y se han asociado con funciones específicas.

En 1986, Shull y colaboradores lograron identificar la expresión de tres isoformas de la subunidad α en rata (Shull y col., 1986). Las distintas secuencias se obtienen por ajuste alternativo de un mismo gen. La **isoforma α_1** es la más abundante y se encuentra presente en virtualmente todas las estirpes celulares. Esta isoforma se relaciona con el mantenimiento de los gradientes electroquímicos y del potencial de membrana. Su expresión es indispensable para la vida; ratones transgénicos deficientes en esta subunidad mueren al poco del parto (Golovina y col., 2003). La **isoforma α_2** es la segunda en importancia cuantitativa. Se ha encontrado expresada en músculo esquelético y cardíaco, riñón, cerebro y célula cromafín. La **isoforma α_3** sólo se expresa en cerebro y riñón (Martín-Vasallo et al., 1994).

Debido a sus similitudes estructurales, funcionales y farmacológicas, es frecuente encontrar en la literatura el término “subunidad α_2/α_3 ” para referirse indistintamente a cualquiera de esas subunidades. Se ha descrito la existencia de una cuarta isoforma de subunidad α , la α_4 , presente en testículos de rata (Blanco y col., 1999), si bien de momento son pocos los estudios que aclaran las razones de su presencia en este órgano.

Se conocen tres isoformas de la subunidad β . Sus niveles de expresión presentan una distribución tisular diferenciada y se sugieren para ellas funciones específicas. Cada una de ellas puede teóricamente combinarse con todas las subunidades α (Crambert y col., 2000), sin embargo sólo algunos dímeros concretos se han encontrado expresados en tejidos. En células cromafines de rata se ha demostrado la coexpresión en membrana de dímeros α_1/β_1 y α_2/β_2 (Lin y col., 2005)

La sensibilidad a glucósidos cardiotónicos y la distribución tisular de las isoformas de subunidad α varía grandemente entre distintas especies. En roedores (rata y cobayo), la isoforma α_1 es resistente a la acción de digitálicos; presenta una K_d tres órdenes de magnitud mayor (orden milimolar) que sus homólogas α_2/α_3 (orden nanomolar) (O'Brien y col., 1994). En humano, perro y oveja las tres isoformas α son muy sensibles a digitálicos (rango nanomolar).

1.2.1.3.- Mecanismos de acción de los glucosidos cardiotónicos.

La inhibición del transporte activo Na^+/K^+ mediante la unión a la NKA es el principal efecto conocido de los esteroides cardiotónicos. A lo largo de los últimos 50 años, se han establecido diversos modelos complementarios para justificar los notables efectos de esta familia de fármacos en el músculo cardíaco, así como sus efectos en el mantenimiento de la homeostasia iónica, la tensión arterial y la secreción de neurotransmisores.

1.- Hipótesis del enlentecimiento de la bomba de sodio

La hipótesis del enlentecimiento de la bomba de sodio ha sido desarrollada desde la década de 1960 en un intento por explicar la acción inotrópica positiva de los digitálicos sobre el músculo cardíaco.

Se explica de la manera siguiente: la unión del glucósido a la bomba NKA inhibe la actividad ATPasa de la bomba impidiendo la salida de Na^+ y la entrada de K^+ a través de la misma. La $[\text{Na}^+]_c$ aumenta progresivamente en la célula y se establece un nuevo equilibrio iónico que permite la reversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que introduce Ca^{2+} para compensar el exceso de Na^+ intracelular. La sobrecarga de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en estas condiciones explica la mayor fuerza de contracción cardíaca y puede generar las arritmias características de la intoxicación digitálica cuando la capacidad de almacenamiento/tamponamiento de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico se ve sobrepasada (Wasserstrom y Aistrup, 2005).

El modelo de enlentecimiento de la bomba de sodio se muestra en la Fig. 4. Está apoyado por multitud de trabajos que demuestran la fuerte relación entre las concentraciones de Na^+ y Ca^{2+} intra y extracelulares, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ del plasmalema (NCX, del inglés *$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger*) y el inotropismo cardíaco inducido por digitálicos (Grupp y col., 1985; Abete y Vasalle, 1988; Tanaka y col., 2007; Altamirano y col., 2006)

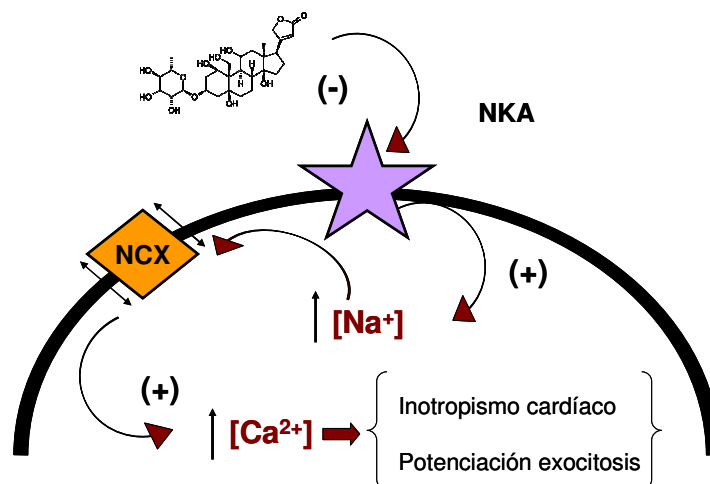


Fig. 4.- Mecanismo de acción de la ouabaína según la teoría del enlentecimiento de la bomba de sodio.

OUB: ouabaína; NKA: bomba Na^+/K^+ ATP-asa; NCX: intercambiador Na^+/Ca^{2+}

2.- Hipótesis del plasmerosoma

Existen algunas evidencias que revelan que el lógico modelo iónico del enlentecimiento de la bomba de sodio no basta para explicar completamente el efecto inotrópico positivo de los digitálicos. Por ejemplo, se ha observado que la ouabaína es capaz de ejercer su efecto inotrópico sin necesidad de aumentar la $[Na^+]_c$ (Arnon y col., 2000). Asimismo, eliminar el Na^+ de las soluciones de trabajo no impide que la ouabaína ejerza su acción inotrópica en el músculo cardíaco (Nishio y col., 2004). Además, otras sustancias inhibitoras del transporte Na^+/K^+ no producen los mismos efectos sobre la contractilidad cardíaca (Potter y col., 2009) ni la secreción de catecolaminas (García y col., 1981).

Estos datos han generado matizaciones de la teoría vigente. El grupo del profesor Blaustein ha desarrollado la teoría del plasmerosoma, según la cual el aumento de $[Na^+]_c$ se produciría en zonas localizadas de la submembrana anejas al NCX. En estas zonas sí se alcanzaría la $[Na^+]$ suficiente para revertir el intercambiador e introducir Ca^{2+} a través del mismo. Estudios de patch-clamp en cardiomiocitos de cobayo apoyan esta teoría (Fujioka y col., 1998).

Se ha encontrado una colocalización en zonas específicas de la membrana plasmática entre la bomba Na^+/K^+ , el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y el retículo endoplásmico en astrocitos, neuronas, cardiomiocitos y células cromafines de rata (Juzashova y col., 1997). En concreto, son las isoformas α_2 y α_3 de la NKA las que colocalizan con estas estructuras, mientras que la α_1 está distribuida homogéneamente por toda la membrana. La isoforma α_2 se ha asociado con el control de la señal intracelular del Ca^{2+} (Golovina y col., 2003) y, además, parece modular la actividad del NCX (Swift y col., 2008).

La proximidad de ciertas regiones del retículo sarco/endoplásmico con el NCX (Blaustein y col., 2002) permite explicar con mayor facilidad que se alteren los procesos de entrada y salida de Ca^{2+} en esta organela, que a su vez son sensibles a cambios en las concentraciones de Na^+ y Ca^{2+} (Sorimachi y col., 1992; Thrower y col., 1998). En cardiomiocitos, se ha observado que la ouabaína incrementa la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (Nishio y col., 2002)

3.- Generación de oscilaciones de Ca^{2+} dependientes del retículo endoplásmico

Utilizando células procedentes del túbulo proximal de distintas especies, se ha demostrado que la bomba Na^+/K^+ es capaz, en presencia de ouabaína, de provocar la apertura directa de receptores de IP_3 de retículo endoplásmico y generar salida de Ca^{2+} en forma de oscilaciones (Aizmann y col., 2001; Miyakawa-Naito y col., 2003). La unión directa del dominio N-terminal de la NKA con el IP_3R es suficiente para generar esta señal sin necesidad de elevar la concentración de IP_3 (Yuan y col., 2005; Wang y col., 2006; Fig. 5). Este fenómeno se ha observado también en astrocitos de hipocampo de rata (Liu y col., 2007).

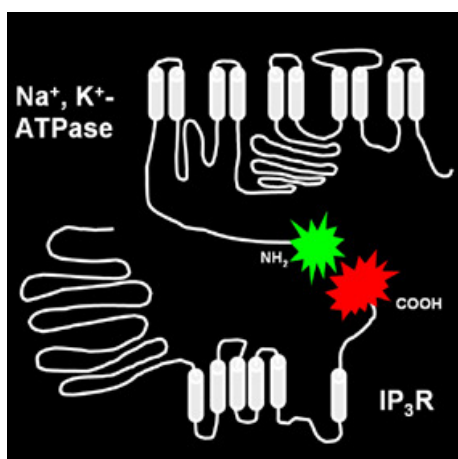


Fig. 5.- La imagen representa cómo el extremo N-terminal de la NKA puede contactar con el IP_3R en presencia de ouabaína. Tomado de http://www.cellphysics.kth.se/ki/pediatric_main.htm con permiso de los autores (Ana Aperia/Hjalmar Brismar, Department of Cell Physics, Karolinka Institutet, Suecia)

Los glucósidos cardiotónicos son también capaces de aumentar la probabilidad de apertura de los RyR de cardiomiocitos de forma dependiente de Ca^{2+} (Rardon y Wasserstrom, 1990).

4.- Regulación génica y activación de cascadas de señalización intracelular por glucósidos cardiotónicos

Además de sus efectos sobre las concentraciones iónicas en la célula, los glucósidos cardiotónicos son capaces de activar rutas de señalización intracelular y modificar la expresión de ciertos genes relacionados con procesos de crecimiento, remodelado cardiovascular, apoptosis y protección celular. Por ejemplo, se ha encontrado que la ouabaina es capaz de modificar la expresión de los genes c-fos y c-jun, NF κ B, n-Bcl2 y caspasas entre otros. La regulación de la expresión génica por ouabaina está al menos en parte regulada por Ca^{2+} y parece estar mediada en algunos casos por CCVD tipo L (Peng y col., 1996; Aizmann y col, 2001).

La ouabaina es capaz de activar el receptor del factor de crecimiento de la epidermis (EGFR, del inglés *epidermal growth factor receptor*) y a través de él, activar la proteína ERK1/2 y la cascada de las MAP kinasas (Plourde y col., 2006). Este proceso es dependiente de proteína quinasa C (Mohammadi y col, 2001).

Otra quinasa activada por ouabaina es la Src-tirosina quinasa, que forma complejos funcionales con la NKA en células renales (Tian y col., 2005) y neuronas corticales (Wang y Yu, 2005). La ruta de la PI₃K/Akt se ha asociado con la hipertrofia cardiaca inducida por glucósidos cardiotónicos (Liu y col., 2007).

5.- Endocitosis de la NKA inducida por ouabaina

Utilizando distintas estirpes de células renales, se ha logrado visualizar la internalización de la subunidad α de la NKA en presencia de concentraciones nanomolares de ouabaina (que no afectan al transporte iónico). Se ha descrito un mecanismo endocitótico dependiente de clatrina y fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI₃K) que, a través de la formación de endosomas, transporta esta subunidad al núcleo (Liu y col., 2004). La dopamina es otra sustancia capaz de provocar endocitosis de la bomba

(Chibalin y col, 1999). El papel funcional de este fenómeno es aún desconocido, pero se piensa que puede tener relación con la activación de Src-quinasas (Liu y col., 2004) y con la modificación de la expresión génica inducida por ouabaína. Recientemente se ha caracterizado la presencia constitutiva de NKA en regiones subplasmalemales que no se relaciona con la función de bombeo iónico sino con la activación de cascadas intracelulares (Liang y col., 2007). Posiblemente exista un recambio de NKA que modula la cantidad de bomba en la membrana para hacer frente a distintas situaciones fisiológicas.

6.- Otros receptores para ouabaína

Se han descrito sitios de unión a ouabaína intracelulares en la membrana del retículo sarcoplásmico de cardiomiocitos de gato que parecen jugar un papel en el acoplamiento excitación-contracción del músculo cardíaco (Fujino y Fujino, 2005).

1.2.1.4.- Acciones a nivel orgánico de los esteroides cardiotónicos: perspectivas terapéuticas

1.2.1.4.1.- Efectos sobre el sistema cardiovascular

La ouabaína ejerce notables efectos sobre la contractilidad cardíaca en humanos y otras especies. Es un agente inotrópico positivo, es decir aumenta la fuerza del latido cardíaco, a la par que disminuye la frecuencia y la conducción cardíacas. Estos últimos efectos parecen relacionados con una acción parasimpatomimética sobre el nervio vago y el seno carotídeo. La ouabaína es también un agente hipertensor que por sí misma aumenta la contractilidad del músculo liso vascular. Se han diseñado antagonistas de la acción de ouabaína que han logrado revertir la hipertensión en modelos animales (Ferrari y col., 2006)

1.2.1.4.2.- Efectos sobre el sistema nervioso central (SNC)

Se ha detectado la presencia de ouabaína y compuestos análogos en el cerebro humano y se supone que es sintetizada en el hipotálamo. Hasta la fecha, no se ha establecido una función distinta del mantenimiento de la homeostasia iónica para la NKA y los esteroides cardiotónicos en el SNC, aunque algunos estudios los asocian con la aparición de trastornos del ánimo (Goldstein y col., 2006). Ciertas mutaciones en la secuencia de la NKA se han correlacionado con la aparición de migrañas, enfermedad de Parkinson y epilepsia (Aperia, 2007).

Además de su papel estabilizador de la estructura de la NKA, indispensable para su funcionamiento como transportador iónico, la isoforma β_2 se ha identificado como la proteína AMOG (*Adhesión Molecule On Glia*) (Gloor y col., 1990) y podría mediar interacciones entre astrocitos y neuronas.

1.2.1.4.3.- Modulación del sistema inmunológico

La bomba Na^+/K^+ , a través de su función como transductor de señales activada por ouabaína, es capaz de modular la proliferación y actividad de células blancas de la sangre (Rodrigues-Mascarenhas y col., 2009).

1.2.1.4.4.- Efectos sobre el metabolismo

La ouabaína aumenta la glucogenosíntesis en el músculo estriado, pudiendo actuar en este tejido como un glucocorticoide. La activación de la ruta Src kinasa se ha asociado con este fenómeno (Kotova y col., 2006).

1.2.2.- La célula cromafín: modelo para el estudio de la neurosecreción

Las **células cromafines** son una estirpe de células neuroendocrinas localizadas fundamentalmente en la médula adrenal de las glándulas suprarrenales. Su función más reconocida es la producción y liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo, jugando un papel crucial en las respuestas simpáticas a nivel sistémico como el disparo de la respuesta de “lucha o huida”, el control de la tensión arterial o la regulación del metabolismo.

Debido a su parentesco y similitud con las neuronas (Patterson, 1990), unido a su facilidad de obtención y uso, las células cromafines se consideran un buen modelo para estudiar fenómenos relacionados con la exocitosis (García y col., 2007). Además, ya que la ouabaína y sustancias afines son constitutivamente sintetizadas en la corteza suprarrenal, el estudio de las acciones de estos compuestos sobre células cromafines constituye un atractivo modelo que permite obtener conclusiones con significado fisiológico.

De cara a una mejor comprensión del proceso secretor en las células cromafines bovinas y cómo la ouabaína puede afectar al mismo, revisaremos a continuación las principales estructuras y procesos implicados en la neurosecreción en células cromafines bovinas (CCB).

1.2.2.1.- El proceso exocitótico en la célula cromafín bovina

La liberación de acetilcolina del nervio esplácnico inicia una cascada de eventos que conducen finalmente a la liberación exocitótica de catecolaminas en la célula cromafín. Todos los pasos son dependientes de Ca^{2+} , que constituye la señal fundamental en el llamado **acoplamiento excitación–secreción**. Este término fue acuñado por Douglas en 1968 en el primer intento por hacer una descripción completa del proceso secretor en células cromafines. Partiendo de los principios propuestos en este artículo y en base a conocimientos actualizados sobre el tema, podemos resumir el proceso secretor en la célula cromafín como sigue (Fig. 6). En resumen, la **acetilcolina** (ACh, del inglés *acetylcholine*), neurotransmisor fisiológico de la sinapsis esplácnico-cromafín (Feldberg y col., 1934), activa los **receptores nicotínicos** de la membrana

plasmática, a través de los cuales pasa una corriente de iones Na^+ y Ca^{2+} (1). Ésto genera una ligera despolarización de la membrana, que si llega a cierto umbral (mV) desencadena la apertura de canales de Na^+ dependientes de voltaje (2), que amplifican la señal despolarizante, permitiendo la apertura de **CCDV** (Fenwick y col., 1982a) y la entrada masiva de Ca^{2+} a través de los mismos (Douglas y Poisner, 1961) (3). El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es una señal necesaria y suficiente para provocar la unión de las **vesículas exocitóticas** a la membrana plasmática y la liberación de los neurotransmisores contenidos en ellas (4). Las **organelas intracelulares**, como la mitocondria (MIT) y el retículo endoplásmico (RE), juegan un relevante papel en el proceso secretor mediante su capacidad de modular la señal de Ca^{2+} originada en el plasmalema (5).

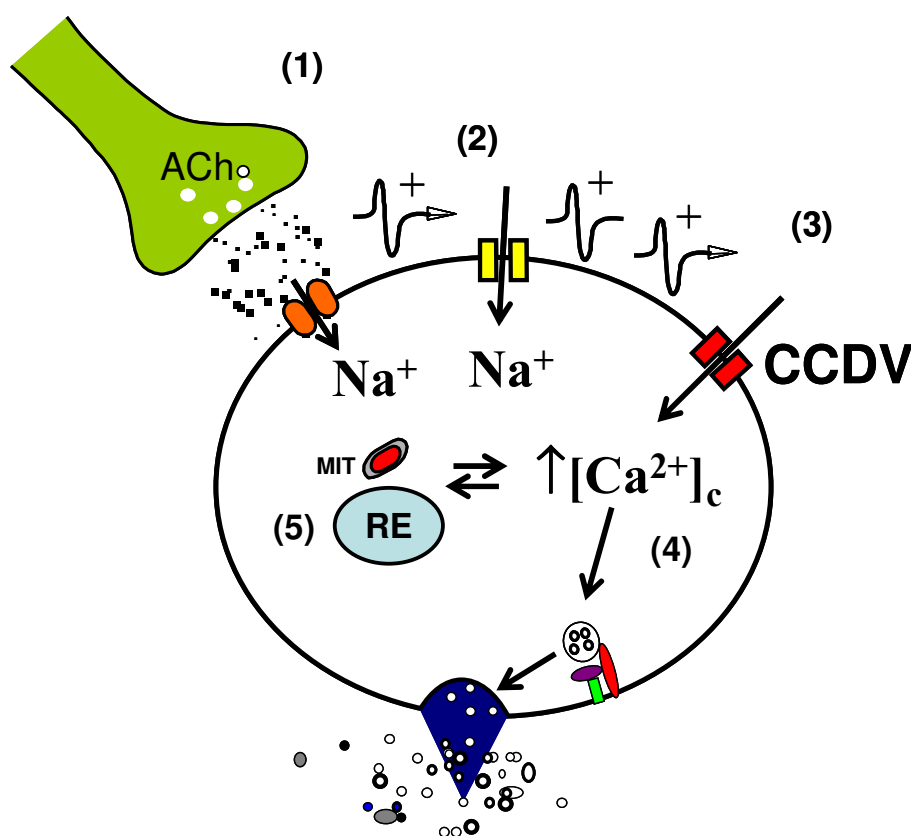


Fig. 6.- Esquema del proceso secretor en CCB. Se muestran las principales estructuras que participan en el disparo del potencial de acción, la entrada y redistribución de Ca^{2+} en el interior celular y la exocitosis. ACh, acetilcolina; CCDV, canales de calcio dependientes de voltaje; MIT, mitocondria; RE, retículo endoplásmico.

1.2.2.1.1.- Receptores nicotínicos para acetilcolina

Estos receptores reconocen selectivamente la ACh liberada por las terminaciones nerviosas preganglionares del nervio esplácnico. Los receptores nicotínicos de la célula cromafín (nAChR, del inglés *nicotinic acetylcholine receptor*) son estructuras pentaméricas formadas por la unión de subunidades llamadas α y β .

Su activación por ACh permite la entrada de Na^+ y, en menor medida, Ca^{2+} , que a su vez provocan cambios en el potencial de membrana y la activación de canales iónicos activados por voltaje. Este papel iniciador del potencial de acción confiere al nAChR un papel primordial en la neurosecreción fisiológica en células cromafines (Lopez y col., 1998). Recientemente, se ha postulado que la estimulación subumbral del nAChR con bajas concentraciones de agonista podría movilizar depósitos intracelulares de vesículas exocitóticas (Arnáiz-Cot y col., 2008; Tapia y col., 2009). Asimismo, se están atribuyendo al receptor $\alpha 7$ propiedades neuroprotectoras en células cromafines (Egea y col., 2007) y en modelos *ex vivo* (Rosa y col., 2006)

1.2.2.1.2.- Canales de calcio dependientes de voltaje

Los CCDV son proteínas heteroméricas de membrana que median la entrada de calcio en la célula en respuesta a cambios en el potencial de membrana. Están presentes en células excitables y no excitables y constituyen un enlace fundamental entre las señales eléctricas y químicas de la superficie de la membrana y las respuestas bioquímicas intracelulares proveyendo una importante fuente de calcio para los procesos básicos en la generalidad de las células como crecimiento, apoptosis y regulación génica (Cano-Abad, 2001) y, en células excitables, los fenómenos de contracción muscular y neurotransmisión (Ruiz-Nuño, 2001).

En función del rango de voltaje en el que los CCVD son activados surge una primera **clasificación electrofisiológica** de los mismos.

Los canales de bajo umbral de activación (*Low Threshold Activated*, LVA) tienen su máxima amplitud de apertura a unos -20 mV. El canal de tipo T es el único canal de Ca^{2+} de bajo umbral descrito hasta la actualidad.

Los canales de alto umbral de activación (*High Voltaje Activated*, HVA) requieren mayores despolarizaciones para su apertura y tienen su máximo de corriente en torno a los 0 mV. Su susceptibilidad al bloqueo con distintos fármacos y toxinas ha permitido establecer una **clasificación farmacológica** de los CCVD HVA (Olivera y col, 1994; García y col., 2006).

Los canales HVA de **tipo L** (del inglés *long lasting*, de larga duración) deben su nombre a la resistencia a inactivación por pulsos largos despolarizantes ($\tau_{\text{inact}} > 500\text{ms}$) (Villarroya y col., 1999). Esta inactivación es dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y no del voltaje de la membrana. Son sensibles a 1,4-dihidropiridinas, y se han descrito sustancias bloqueantes como el nifedipino, y activadores como el BayK8644 (García y col., 1984).

Los CCDV **tipo N** son un grupo heterogéneo de canales que precisan grandes despolarizaciones para su activación. En contra de lo que ocurre con los canales L, se inactivan rápidamente a potenciales despolarizantes, aunque de forma incompleta (Fox y col., 1987a y b; Plummer y col., 1989). Actualmente, la mejor forma de caracterizarlos es utilizando criterios farmacológicos debido a su insensibilidad a las DHP y a su bloqueo por ω -CTx-GVIA (100-500 pM) (Aosaki y Kasai, 1989; Regan y col., 1991) y por ω -conotoxina MVIIC ω -CTx-MVIIC) (Martin-Moutot y col, 1995) a concentraciones mayores de 100 nM (Birnbaumer y col., 1994).

Los canales de calcio **tipo P** fueron descritos por primera vez en las células de Purkinje del cerebelo de donde obtienen su nombre (Llinás y col., 1991; Mintz y col., 1992a). La ω -agatoxina-IVA (Aga-IVA) es un péptido de 28 aminoácidos purificado a partir del veneno de *A. aperta* y debido a su potencia y selectividad es el bloqueante más utilizado para el estudio y caracterización farmacológica de los canales de tipo P (Mintz y col., 1992a y b).

Al igual que los canales de tipo P, los de **tipo Q** son resistentes a las DHP pero se diferencian porque presentan una menor sensibilidad a ω -Aga-IVA (son bloqueados a concentraciones > 10 nM) (Zhang y col., 1993; Birnbaumer y col., 1994), tienen una cinética de inactivación más rápida y presentan una elevada sensibilidad a ω -CTx-

MVHC (rango nM) (Sather y col., 1993). Debido a la dificultad de distinguir farmacológicamente a los canales del subtipo P de los del subtipo Q, suele empearse en la literatura el término “canal P/Q” para referirse a los canales bloqueados selectivamente por Aga-IVA.

Existe un último tipo de CCDV insensible al bloqueo por dihidropiridinas y las toxinas selectivas para canales N y P/Q, el CCDV **tipo R**. Se ha demostrado su presencia en células cromafines de rata (Carabelli y col., 2003), ratón (Aldea y col., 2002; Albillos y col., 2000) y humanas (Pérez-Álvarez y col., 2008) utilizando la técnica de patch-clamp en su configuración de parche perforado.

1.2.2.1.3.- El retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico (RE) es una organela con alta capacidad de retención de Ca^{2+} . La concentración de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$, se ha estimado en unos 5-10 mM, si bien buena parte del mismo se encuentra unido a proteínas quelantes de Ca^{2+} (reticuloplasminas) como la calreticulina, dejando concentraciones de Ca^{2+} libres que van desde el micromolar hasta 3 mM (Meldolesi y Pozzan, 1998; Alonso y col., 1999). El RE es un entorno idóneo para el procesamiento postraducciona l de proteínas (plegado, glicosilación...), que son maduras y empaquetadas en esta organela antes de alcanzar su destino final (generalmente, la membrana plasmática).

El Ca^{2+} del RE es dinámico y se encuentra en un continuo proceso de secuestro y liberación. Está implicado en varios procesos de señalización de Ca^{2+} intracelular, desde los más rápidos, como la neurosecreción hasta las respuestas adaptativas a largo plazo (Verkhatsky, 2004; Berridge, 1993). Las alteraciones de la homeostasia del Ca^{2+} reticular pueden conducir a la expresión de señales citoprotectoras y/o apoptóticas con relevancia clínica en enfermedades neurodegenerativas (Paschen, 2003 a y b).

El retículo endoplásmico no es una organela homogénea sino que consta de compartimentos diferenciados en cuanto a sus proteínas de membrana, sugiriendo que el RE puede generar y controlar una multitud de señales de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Golovina y Blaustein, 1997). Alonso y colaboradores (1999) describieron diferencias cuantitativas en la salida de Ca^{2+} reticular inducida con cafeína e histamina que indican la posible existencia de al

menos dos depósitos de Ca^{2+} en células cromafines bovinas: uno dependiente de inositol trisfosfato (IP_3) y uno IP_3 -independiente (Cheek y col., 1991).

En la célula cromafín bovina se conocen tres estructuras en la membrana del RE que predominan en el manejo de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$: la SERCA (del inglés, *SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase*), los receptores de rianodina (RyR) y los receptores de inositol trisfosfato (IP_3R).

La **SERCA** es una ATPasa tipo P que toma Ca^{2+} del citosol y lo introduce en el lumen reticular en contra de gradiente electroquímico. El proceso requiere gasto energético en forma de ATP. Su afinidad por el Ca^{2+} está comprendida entre 0'1 y 1 μM . Se conocen dos isoformas de SERCA expresadas en CCB, la 2b y la 3 (Poulsen y col., 1995). Ambas son inhibidas por tapsigargina, una lactona sesquiterpénica encontrada en la especie *Thapsia garganica* (Lytton y col., 1991). La inhibición de la SERCA impide la entrada de Ca^{2+} en el RE y como consecuencia el depósito se va vaciando progresivamente (Alonso y col., 1999).

Los **IP_3R** se encuentran en virtualmente todos los tipos celulares. Son canales de Ca^{2+} activados por ligando, en concreto el IP_3 que se produce en el interior de la célula por la activación de la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza el fosfatidilinositol bisfosfato (PIP_2) de la membrana plasmática en IP_3 y diacilglicerol (DAG). La activación de PLC en CCB puede inducirse por la unión de histamina a receptores histaminérgicos H_1 de la membrana plasmática. El DAG a su vez activa la proteína quinasa C (PKC) que limita la salida de Ca^{2+} a través del IP_3R (Fig. 7). La apertura de los IP_3R está regulada por la $[\text{Ca}^{2+}]$ extraluminal y adopta una curva de activación en campana que tiene su máximo en torno a los 200 nM (Thrower y col., 1998; Bezprozvanny y col., 1991). El receptor de IP_3 se ha asociado con funciones de crecimiento y maduración, fertilización, extensión de neuritas, expresión génica y la secreción de neurotransmisores (Berridge, 1993)

Farmacológicamente, podemos inhibir la activación de los IP_3R mediante el fármaco permeable 2-APB (Maruyama y col., 1997). La xestospongina C y la heparina también bloquean los IP_3R .

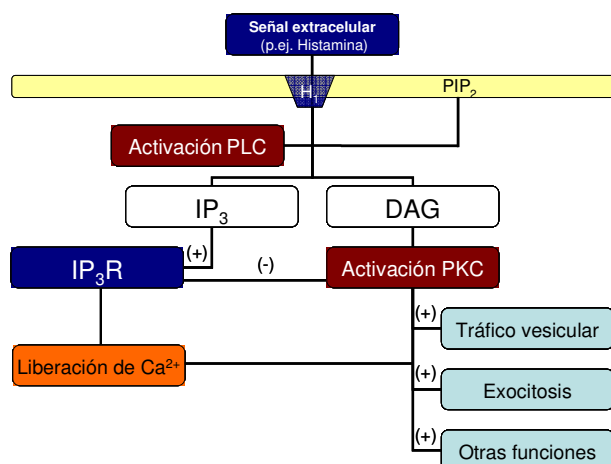


Fig. 7.- Cascadas intracelulares promovidas por la activación de receptores histaminérgicos en CCB. H_1 , receptor histaminérgico; PIP_2 , fosfatidilinositol bisfosfato; PLC, fosfolipasa C; IP_3 , inositol trisfosfato; DAG, diacilglicerol; IP_3R , receptores de inositol trisfosfato; PKC, proteína kinasa C.

Los **RyR** se activan por la presencia de Ca^{2+} extraluminal (Zucchi y Ronca-Testoni, 1997) y son responsables del fenómeno de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} o CICR (*Calcium Induced Calcium Release*), según el cual diversos agentes que promueven incrementos en la $[Ca^{2+}]_c$ provocan liberación de Ca^{2+} del RE. Esta liberación se ha asociado con un mejor funcionamiento de la migración vesicular (Fabiato, 1983; Alonso y col., 1999). Los RyR también presentan una curva de activación en campana, ocurriendo que la apertura del canal se inhibe a concentraciones de Ca^{2+} superiores a 150 μM (Meissner y col., 1986). El ion Ca^{2+} es el principal regulador conocido de los RyR, pero también son modulables fisiológicamente por cADPR, ATP y Mg^{2+} , proteínas quelantes de Ca^{2+} (calmodulina y calsecuestrina) y fosforilación mediada por proteína cinasa A (Fill y Copello, 2002).

La rianodina, un alcaloide de *Ryania speciosa*, además de dar nombre al canal, modula la actividad del mismo. A una concentración de 10 μM , deja el canal en un estado de semiconductancia inactivable por Ca^{2+} , produciendo el vaciado del depósito de Ca^{2+} RyR-dependiente en CCB (Rousseau y col., 1987; Buck y col., 1992). Otro compuesto activo sobre el RyR es la cafeína, que actúa como agonista del canal a concentraciones milimolares (Cheek y col., 1993). La aplicación continuada de este fármaco vacía el depósito de Ca^{2+} reticular en células cromafines (Alonso y col., 1998).

En células cromafines, como en muchas otras estirpes celulares, se ha identificado una corriente de entrada de iones Na^+ y Ca^{2+} a través de la membrana plasmática consiguiente a la liberación de Ca^{2+} del RE. Este fenómeno se conoce como **entrada de calcio operada por depósito** (SOCE, del inglés *Store Operated Calcium Entry*). Su función más reconocida es la de suministrar iones Ca^{2+} para el rellenado del RE. La corriente está mediada por canales iónicos tipo TRPC (*Transient Receptor Potential Channel*), que son inespecíficos para Na^+ y Ca^{2+} ; en células PC12 se ha descrito la existencia de los subtipos TRPC 3, 4 y 6 (Tesfai y col., 2001; Obukhov y Nowycky, 2002). La SOCE es activa constitutivamente en CCB (Cheek y Thorn, 2006) y se puede inducir por agentes que originan salida de Ca^{2+} reticular como tapsigargina, cafeína o histamina (mediante la producción de DAG) (Robinson y col., 1992, Putney Jr., 2007). Esta señal origina y modula respuestas secretoras en CCB (Fomina y Nowycky, 1999; Zerbes y col., 2001).

1.2.2.1.4.- Control de la secreción por organelas intracelulares: La tríada funcional, NCX y SOCE

Existe una estrecha relación entre la gestión del Ca^{2+} intracelular por el RE y la mitocondria y aquél que procede del medio extracelular a través de CCDV, el NCX y la SOCE. La exocitosis se ve asimismo afectada por el secuestro y liberación de Ca^{2+} en las organelas intracelulares en CCB. Por un lado, la histamina y la cafeína, agonistas de los IP_3R y RyR respectivamente, generan por sí mismas una señal exocitótica (Marley y col., 2003, Cheek y col., 1990). Por otro, estimulan la salida de Ca^{2+} del RE con histamina tiene efectos potenciadores sobre la secreción de catecolaminas (Houchi y col., 1997), mientras que vaciar el depósito con cafeína o tapsigargina deprime la respuesta secretora (Pan y Fox, 2000; Lara y col., 1997). El mecanismo de CICR a través de los RyR se ha mostrado como factor necesario para la movilidad vesicular (Shakyrianova y col., 2007). Este hecho implica al depósito de Ca^{2+} reticular con la recarga de depósitos vesiculares y puede explicar por sí mismo los efectos moduladores de la secreción (Augustine y Neher, 1992). La proteína PKC, que está relacionada con la movilización del Ca^{2+} del RE, también modula la exocitosis afectando el tráfico vesicular (Gillis y col., 1996).

Se ha postulado la teoría de la **tríada funcional** (Fig. 8), según la cual la señal de Ca^{2+} originada por apertura de CCDV en células cromafines bovinas sería modulada por el RE y la mitocondria. En el RE, el fenómeno de CICR ocurre tras la entrada masiva de Ca^{2+} por CCDV. Este Ca^{2+} de origen reticular amplificaría la señal de Ca^{2+} proveniente del exterior de la célula, potenciando la exocitosis y aumentando la movilidad vesicular. La mitocondria es capaz en estas condiciones de capturar grandes cantidades de Ca^{2+} a través del MCU, que libera progresivamente de vuelta al citosol. Existe asimismo una comunicación entre RE y mitocondria ya que señal de Ca^{2+} generada por estimulación de IP_3R es captada por la mitocondria (Montero y col., 2002). La señal de Ca^{2+} originada por la apertura de CCDV es distribuida por las organelas intracelulares en forma de microdominios que modulan la exocitosis en CCB (García y col., 2007).

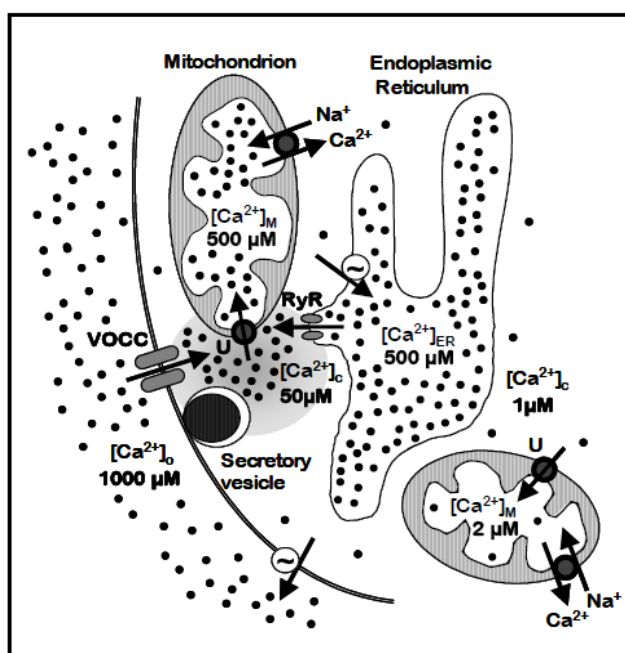


Fig. 8.- La tríada funcional en células cromafines bovinas: La señal de Ca^{2+} procedente de los canales de calcio dependientes de voltaje (VOCC, del inglés *voltage-operated calcium channels*) activa el mecanismo CICR a través de los RyR del RE generando microdominios con alta $[\text{Ca}^{2+}]_c$. El Ca^{2+} es también capturado por el uniportador mitocondrial (U), produciendo elevaciones transitorias de la $[\text{Ca}^{2+}]_{mit}$. Tomado de García y col., *Physiol.Rev.*, 2006.

Existen evidencias que asocian la actividad del **intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$** del plasmalema (NCX) con el depósito de calcio del retículo endoplásmico. El NCX es una estructura proteica de membrana que transporta de forma antiparalela iones Na^+ y Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. Este transporte se efectúa a favor de gradiente

electroquímico para ambos iones y no requiere de gasto energético. La estequiometría de la reacción es de tres iones de Na^+ por uno de Ca^{2+} ; por lo tanto la actividad del intercambiador es electrogénica. Este intercambio puede producirse en cualquier sentido y se describen dos modos de funcionamiento del NCX: sacando iones Na^+ del citosol e introduciendo iones Ca^{2+} del medio extracelular (modo directo) o viceversa, introduciendo Ca^{2+} y extrayendo Na^+ (modo reverso). Este modo reverso se activaría en situaciones de elevación de la $[\text{Na}^+]_i$, como es el caso del modelo propuesto para la acción de los glucósidos cardiotónicos.

Pan y colaboradores han observado que el bloqueo de la SERCA con thapsigargina disminuye la elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ provocada por el modo reverso del NCX (Pan y col., 2006). También se postula que el intercambiador puede ser una fuente de calcio para el rellenado del retículo (Hirota y col., 2007), mientras que, usando otros protocolos, otros autores observan liberación de Ca^{2+} de esta organela debida a la activación del modo reverso del NCX (Wu y col., 2008). Diferentes isoformas del NCX pueden afectar de forma distinta al Ca^{2+} reticular y a susceptibilidad celular a la sobrecarga de Ca^{2+} (Hurtado y col., 2006).

La SOCE genera una corriente inespecífica de Na^+ y Ca^{2+} . El Ca^{2+} que ingresa por los canales de calcio operados por depósito (SOCC, *Store Operated Calcium Channels*) se utiliza para recargar el RE mediante la actividad de la SERCA. Además, el Na^+ que entra en la célula por TRPC puede inducir la actividad reversa del NCX, que introduciría más Ca^{2+} que también se utilizaría en el rellenado del RE (Lemos y col., 2007). Estos datos indican que existe un equilibrio funcional entre las organelas intracelulares y ciertas estructuras de la membrana plasmática que afecta tanto a la señal de Ca^{2+} intracelular como a la exocitosis en células cromafines (Yang y col., 2001).

1.2.2.1.5.- Las vesículas exocitóticas: procesos de maduración y transporte

El principal tipo de vesícula existente en las células cromafines son las llamadas “**vesículas grandes de núcleo denso**” (LDCV, *large dense core vesicles*). La biosíntesis de las vesículas comienza en el aparato de Golgi, donde se produce el ensamblaje de proteínas específicas a membranas inmaduras. Las vesículas recién formadas sufren procesos de **maduración y transporte** hasta que alcanzan la

membrana plasmática para ser exocitadas. Diversos autores han establecido la existencia de hasta cuatro depósitos o poblaciones de vesículas cromafines en función de este estado de madurez (von Ruden y Neher, 1993, Fig.9; Nofal y col., 2007). Para los propósitos de este trabajo, consideraremos un modelo bicompartimental formado por:

i) El depósito de reserva (RP, reserve pool). La mayoría de las vesículas ($\approx 95\%$) se encuentran alejadas de la membrana plasmática. Se ha estimado que la migración de estas vesículas hacia las zonas subplasmalemales requiere de unos 6 minutos (Steyer y col, 1997) y de concentraciones de Ca^{2+} en el rango submicromolar.

ii) El depósito de vesículas maduras (primed pool). En esta última etapa del proceso de maduración, las vesículas van incorporando progresivamente varias proteínas y ocupan su localización final adyacente a la membrana. Tras ser liberados, se calcula que estos depósitos se recargan en aproximadamente un minuto (Smith y col., 1998) en un proceso que depende de la $[\text{Ca}^{2+}]$ y de la temperatura (Von Ruden y Neher, 1993; Bittner y Holz, 1992). La enzima soluble PKC se ha asociado con esta etapa de maduración vesicular por su implicación en la expresión de la proteína SNAP-25 del complejo SNARE (Montiel y col., 2003)

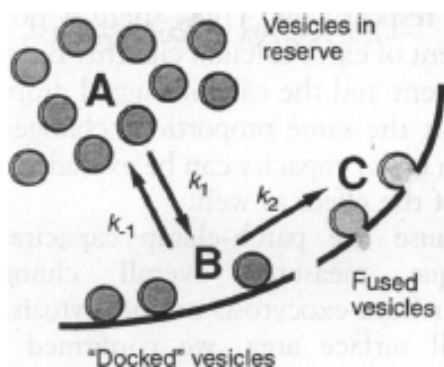


Fig. 9.- Modelo de depósitos de vesículas propuesto por von Ruden y Neher en 1993. Las vesículas en reserva (A) se encuentran alejadas de la membrana y pasan a un estado anclado ("docked", B) en el subplasmalema mediante un proceso reversible dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Son estas vesículas las que son aptas para fusionarse con la membrana en el proceso exocitótico (C).

II. Hipótesis y objetivos

Apunta a la luna. Si fallas, podrías darle a una estrella
W. Clement Stone

La capacidad de inhibir el transporte activo de Na^+ y K^+ y la consiguiente alteración de las concentraciones intracelulares de iones se ha considerado durante años la explicación única para las acciones neuropotenciadoras de los esteroides cardiotónicos sobre la exocitosis. En células cromafines bovinas se ha demostrado la calcio-dependencia del fenómeno, observado cambios en las concentraciones basales de Ca^{2+} citosólico (de la Fuente y col., 1996) y se ha atribuido su origen al intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a través del plasmalema (Torok y col, 1990).

En los últimos años se ha encontrado una clara relación entre el proceso exocitótico y la gestión de Ca^{2+} por organelas intracelulares. En concreto, la captación y liberación de Ca^{2+} por el retículo endoplásmico se ha asociado con alteraciones en la exocitosis a corto y medio plazo, indicando posibles influencias sobre las distintas poblaciones de vesículas secretoras presentes en células cromafines. Algunos trabajos apuntan a una conexión funcional entre el efecto de ouabaína sobre la NKA y el RE. Una acción demostrada de los glucósidos cardiotónicos es la reversión del NCX, que introduciría Ca^{2+} a expensas del acúmulo de Na^+ en el citosol generado como consecuencia de la inhibición de la NKA.

Partiendo de estos indicios, el presente trabajo pretende replantear el estudio del mecanismo de acción del esteroide cardiotónico ouabaína para explicar su efecto potenciador de la neurotransmisión utilizando como modelo la célula cromafin bovina. Nuestro estudio se centra en el depósito de Ca^{2+} intracelular del retículo endoplásmico, partiendo de la hipótesis de que la ouabaína podría liberar Ca^{2+} de dicho depósito aumentando así la disponibilidad de vesículas disponibles para ser exocitadas. Para someter a escrutinio esta hipótesis, planteamos los siguientes objetivos:

- 1) En primer lugar, describiremos el fenómeno de potenciación de la exocitosis inducido por ouabaína en preparaciones de células cromafines bovinas utilizando diferentes protocolos de estimulación y la medida amperométrica de la secreción. Se utilizarán soluciones despolarizantes ricas en K^+ para inducir la exocitosis mediante la apertura de canales de calcio voltaje-dependientes (CCVD), secretagogos que movilicen las

reservas de Ca^{2+} intracelular (cafeína e histamina), reintroducción de Ca^{2+} para activar la entrada capacitativa de Ca^{2+} y ACh, sustancia que promueve la liberación de neurotransmisores en un proceso similar al fisiológico.

- 2) Una vez caracterizada la acción de ouabaína sobre la exocitosis bajo diferentes condiciones de estimulación, se estudiará la influencia sobre la misma del bloqueo farmacológico de estructuras de membrana asociadas a la entrada de Ca^{2+} y al fenómeno excitotóxico en la célula cromafín como los CCVD y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX).
- 3) Se valorará la participación del retículo endoplásmico (RE) y su capacidad de gestión de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a través de canales y bombas de Ca^{2+} (RyR, IP_3R , SERCA) en la potenciación ouabaínica. Utilizaremos para ello la medida amperométrica de la secreción, diversos bloqueantes farmacológicos y medidas directas de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$.
- 4) Asimismo, visualizaremos y analizaremos la movilidad de las vesículas exocitóticas mediante TIRF para saber si la ouabaína puede estar modificando los procesos de maduración y transporte de las mismas.
- 5) Finalmente, estudiaremos la posibilidad de que la ouabaína unida a la NKA pueda incorporarse al citosol mediante un proceso de endocitosis.

III. Materiales y métodos

Cualquier tecnología lo suficientemente avanzada es indistinguible de la magia
Arthur C. Clarke

3.1.- Aislamiento y cultivo de células cromafines bovinas.

Las células cromafines bovinas se aislaron de glándulas adrenales de terneras de aproximadamente un año de edad siguiendo métodos estandarizados (Livett, 1984) con algunas modificaciones (Moro y col., 1990). Las células se suspendieron en Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y se suplementaron con un 5% de suero fetal bovino, 10 μ M de citosina arabinósido, 10 μ M de fluorodeoxiuridina, 50 IU/ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomicina. Para los experimentos de secreción de catecolaminas, las células se sembraron en placas Petri de 60 mm a una densidad de 10^6 células/ml (5 ml por placa). Para los experimentos de patch-clamp y medida de $[Ca^{2+}]_{RE}$, se sembraron en cubreobjetos de 12 mm de diámetro cubiertos con polilisina (0'1mg/ml). Para los experimentos de medida de $[Ca^{2+}]_c$, de microscopía confocal y de TIRFM, se sembraron en cubreobjetos de 25 mm de diámetro, también con polilisina. Las células se mantuvieron de 1 a 4 días en un incubador a 37°C, saturado de humedad y con un 5% CO₂/95% de aire atmosférico.

3.2.- Medida en tiempo real de la liberación de catecolaminas de poblaciones de células cromafines bovinas.

Las células se separaron cuidadosamente del fondo de la placa Petri con una espátula de goma y fueron centrifugadas a 800 rpm durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en 200 μ l de Krebs-Hepes (composición en mM: NaCl 144; KCl 5.9; MgCl₂ 1.2; glucosa 11; Hepes 10; pH 7.4) con 0 ó 2 mM CaCl₂ según se requiriese. Se introdujo a las células en una microcámara de 100 μ l y se perfundieron las soluciones del experimento a una velocidad de 2 ml/min. El líquido que salía de la cámara de perfusión se dirigía a un detector electroquímico modelo Metrohn AG CH-9100 Hersau colocado al lado de la cámara que monitorizaba en tiempo real en su modo de medida amperométrica la cantidad de catecolaminas secretadas (Borges y col., 1986). Se estimuló las células con pulsos de 10 segundos de duración aplicados cada 3 minutos con distintas soluciones según el experimento. Se utilizó una solución de Krebs- Hepes que contenía 35 mM de K⁺ mediante una sustitución isoosmótica de NaCl por KCl, soluciones con 20 mM de cafeína o 100 μ M de histamina y la reintroducción de una

solución Krebs-Hepes estándar con 2 mM de Ca^{2+} sobre otra con 0 mM de Ca^{2+} nominal que se perfundía a las células. Las soluciones se intercambiaron rápidamente a través de electroválvulas controladas por un ordenador. Todos los experimentos de secreción se realizaron a 37°C que se alcanzaron sumergiendo las soluciones de perfusión en un baño termostático e introduciendo la camarita de perfusión en una camisa termostaticadora.

3.3.- Medida del potencial de membrana mediante la técnica de patch-clamp en la modalidad de parche perforado.

Para las medidas de potencial de membrana la solución extracelular tenía la siguiente composición (en mM): 145 NaCl, 1 MgCl_2 , 10 HEPES, 5.5 KCl y 10 glucosa y 0 ó 2 Ca^{2+} según se requiriese. Para los experimentos de despolarización con K^+ , se substituyó isoosmóticamente el NaCl por 35 ó 100 mM de KCl según el caso. La solución intracelular contenía (en mM): 145 KCl, 9 NaCl, 1 MgCl_2 , 10 HEPES y 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B. El pH se ajustó a 7.2 con KOH. Se prepararon soluciones madre de anfotericina B (50 mg/ml) disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) y se mantuvieron congeladas y protegidas de la luz. La concentración final se alcanzó tras sonicar y diluir en solución intracelular. Las pipetas se fabricaron estirando capilares de vidrio borosilicatado, se las cubrió con una fina capa de cera y se pulieron con ligeras aplicaciones de calor en una microforja. La resistencia de las mismas fue de 3-5 M Ω . Antes de proceder al rellenado de la pipeta, su punta se sumergía en solución intracelular sin anfotericina B. Una vez realizado el sello, el potencial de membrana se ajustó a -80 mV y se dejó a la anfotericina actuar durante 10-15 minutos hasta que la resistencia de acceso estuvo en torno a 20 M Ω . Se descartaron los sellos con valores de fuga mayores de 5 pA. Se registró el potencial de membrana durante un periodo de 5-10 minutos en los cuales se dieron pulsos breves de 8 segundos con soluciones extracelulares que contenían 35 mM K^+ ó 100 mM K^+ y 0 ó 2 mM Ca^{2+} según el caso. El cambio de soluciones se realizó mediante una pipeta con cinco vías controladas por electroválvulas que se situó en las inmediaciones de la célula. No se corrigieron el potencial de baño ni la fuga. Los datos se registraron mediante un amplificador EPC-9 (HEKA) conectado a un PC donde se ejecutaba el programa Pulse. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

3.4.- Registro amperométrico de la liberación cuantál de catecolaminas en células individualizadas.

La liberación de catecolaminas en células individualizadas se midió por amperometría (Wightman y col., 1991; Chow y col., 1992). Los electrodos se construyeron según lo descrito (de Diego y col., 2008) introduciendo una fibra de grafito de 10 μM de diámetro (Amoco) en capilares de vidrio (Kimble-Kontes). El amperómetro se conectó a una interfase (Powerlab/45P AD instruments, New Zealand) que digitalizó la señal a 10 kHz y la envió a un ordenador Apple Macintosh Power PC y se visualizó con el software Chart v.4.2 (AD instruments, New Zealand). Se aplicó al electrodo un potencial de 730 mV (con respecto a un electrodo de AgCl). Los electrodos se calibraron siguiendo buenas prácticas de amperometría (Machado et al., 2008) perfundiendo noradrenalina (50 μM) disuelta en solución Tyrode y midiendo la corriente generada; sólo se usaron los electrodos que produjeron corrientes entre 200 y 400 pA.

Los cubreobjetos se montaron en la camarita de un microscopio invertido Nikon Diaphot. Las células se perfundieron continuamente, con una pipeta de 5 vías controlada eléctricamente, con una solución Tyrode con la siguiente composición (en mM): 137 NaCl, 1 MgCl_2 , 5.3KCl, 2 CaCl_2 , 10 HEPES y 10 glucosa (pH 7.3, ajustado con NaOH). La solución con K^+ elevado (24 mM K^+) se elaboró reemplazando equiosmolarmente NaCl con KCl. La solución de Ba^{2+} se preparó sutituyendo el CaCl_2 por 5 mM BaCl_2 . A la hora de los experimentos, se disolvieron las cantidades apropiadas de ouabaína en solción Tyrode. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ($24\pm 2^\circ\text{C}$).

3.5.- Medida de I_{Ba} mediante la técnica de patch-clamp en la modalidad de célula entera.

Para las medidas de I_{Ba} la solución extracelular tenía la siguiente composición (en mM): 145 NaCl, 1 MgCl_2 , 10 HEPES, 5.5 KCl y 10 glucosa y 10 BaCl_2 . La solución intracelular contenía (en mM): 145 KCl, 9 NaCl, 1 MgCl_2 , 10 HEPES. El pH se ajustó a 7.2 con KOH. Se utilizaron pipetas de vidrio borosilicatado con una

resistencia de 3-5 MΩ. El potencial de membrana se fijó a -80 mV previo a la apertura del sello. Se descartaron los sellos con valores de fuga mayores de 20 pA. Se aplicaron trenes de pulsos desde el potencial de fijación a -10 mV de 50 ms de duración cada 30 s. La célula fue perfundida durante todo el experimento mediante una pipeta multicanal situada en las inmediaciones de la misma que permitía un rápido intercambio de solución extracelular. Tras cinco pulsos control, se perfundieron los fármacos de estudio durante otros cinco pulsos. No se corrigieron el potencial de baño ni la fuga. Los datos se registraron mediante un amplificador EPC-9 (HEKA) conectado a un PC donde se ejecutaba el programa Pulse. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

3.6.- Medida de $[Ca^{2+}]_c$ mediante la sonda fluorescente Fluo-4.

Las células sembradas en cubreobjetos de 25 mm de diámetro a una densidad de 1×10^5 células/cubre se incubaron a 37°C en presencia de 2 μM de la sonda fluorescente Fluo-4-AM. Tras este periodo se lavaron dos veces durante 10 minutos con solución estándar de Krebs-Hepes con 0 ó 2 mM Ca^{2+} según se requiriese (ver composición en el apartado 3.2). El sistema de imagen consistía en un microscopio confocal (MRC 1024; Bio-Rad) acoplado a un PC. La excitación de la sonda se produjo a 488 nm con un láser de Kr-Ar y se midió la emisión a 522 ± 32 nm. La frecuencia de adquisición de las imágenes fue de 0.5 Hz. Se corrigió el fondo para cada experimento. Las células se estimularon mediante un sistema de perfusión como el descrito en 3.3 controlado por otro ordenador con pulsos de 10 segundos de duración cada 3 minutos. Los cambios en la fluorescencia de Fluo-4 no se calibraron y se muestran como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente y en oscuridad.

3.7.- Medida de $[Ca^{2+}]_{RE}$ en células cromafines bovinas transfectadas con camaleón-D1

Para estos experimentos se utilizaron células cromafines bovinas transfectadas con el plásmido camaleón-D1 y mantenidas en cultivo 3-4 días para la expresión de la proteína. La transfección se efectuó por electroporación con el Nucleofector de Amaxa

de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se resuspendieron 2×10^6 células en 100 μ l de solución de electroporación a la que se habían añadido 2 μ g de ADNc con 1 plásmido que codifica para la proteína camaleón-D1. Este plásmido fue un generoso regalo del Dr. Roger Tsien. Para la transfección se utilizó el protocolo A-033. Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo DMEM sin inhibidores del crecimiento de fibroblastos, suero ni antibióticos y se sembraron en cubreobjetos de 18 mm de diámetro en placas de 24 pocillos. Tras 5 h, se reemplazó el medio por DMEM suplementado cada 24 h.

Tras 3-4 días en cultivo, se colocaron los cubreobjetos en una camarita de perfusión acoplada a un microscopio de fluorescencia invertido (BX51WIF, Olympus) con un objetivo Olympus 40X (NA=0.9). Para la medida de cocientes de la fluorescencia, se excitó a 440 nm y se midió la emisión a 512 y 480 nm. La rueda de filtros (440DF20), los filtros dicróicos (455DRLP) y los filtros de emisión (480DF30 y 535DF25) se adquirieron de Omega Optical and Chroma Technologies (Brattleboro, VT, USA). Las imágenes fueron capturadas con una cámara CCD (Sony). La sincronización de la cámara y la adquisición de datos brutos se realizaron con el software Cell R de Olympus (versión 2.6). El cociente de fluorescencia 512/480 se calculó y normalizó con el software MS Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$).

3.8.- Medida de la movilidad vesicular mediante la técnica de TIRFM

Para los experimentos de TIRFM, se aislaron células cromafines bovinas y se electroporaron con el Nucleofector de Amaxa de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Un millón de células se resuspendieron en 100 μ l de solución de nucleofección a la que se añadieron 2 μ g de cDNA que codificaba para NPY-EGFP. Este plásmido es un regalo del Dr. Wolfhard Almers (Taraska y col., 2003). Para la transfección se utilizó el protocolo O-001. Las células fueron sembradas a una densidad de 5×10^5 en cubreobjetos de 18 mm de diámetro y colocadas en placas de 6 pocillos. Las células se incubaron durante 5 h en un medio sin suero ni antibióticos y con DNase I (10 μ g/ml). Tras este periodo, el medio se suplementó con 10% SBF. Las células se utilizaron 24-48 h después.

Las células se visualizaron en un microscopio invertido (Zeiss 200M) a través de un objetivo 100X (alpha Fluor, 100X/1.45 N.A., Zeiss). Para el enfoque, se utilizó un

líquido de inmersión especial ($n_{488} = 1.518$; Zeiss). Para la iluminación en campo evanescente, se utilizó un láser de argón (Lasos, Lasertechnik GmbH, Germany). El haz de luz (488 nm) atravesó un filtro de banda de emisión (488/10; Zeiss) y se utilizó para excitar la EGFP. El haz de luz se enfocó a una posición fuera del eje en el plano focal posterior del objetivo. En estas condiciones, la luz que impacta en el cubreobjetos entra en reflexión total interna y queda atrapada en la interfase del vidrio del cubreobjetos y la solución o célula encima de él. La reflexión total interna genera un campo evanescente que decae exponencialmente con la distancia a la interfase, dependiendo del ángulo con el que impacta a esta interfase (Axelrod y col., 1983; Steyer y Almers, 2001). Las imágenes se proyectaron en una cámara CCD (AxioCam MRm, Zeiss) tras pasar por filtros dicróicos (FT500) y de banda (525/50 nm). Se tomaron imágenes de células individuales iluminadas por un campo evanescente con el software Axiovision (Zeiss) durante 2 min con exposiciones de 250 ms a una frecuencia de 2 Hz.

Las imágenes fueron analizadas con el software MM. Se marcó la posición de cada vesícula y se rastreó su posición con respecto al tiempo para medir el desplazamiento cuadrado medio (Allersma y col., 2004; Camacho y col., 2008; Steyer y Almers, 1999).

3.9.- Seguimiento de la internalización de ouabaína fluorescente utilizando microscopía confocal.

Se sembraron células cromafines bovinas en cubreobjetos de 18 mm a una densidad de 2×10^5 . Tras 24-48 h en cultivo, los cubreobjetos se montaron en un microscopio confocal Leica SP-5 con opción de control de temperatura y CO_2 , que permitió trabajar a 37°C y 5% CO_2 . Una vez colocadas las células en la camarita del microscopio, se añadió la sonda fluorescente ouabaína-Bodipy a una concentración de 300 nM y se procedió a obtener imágenes secuenciales en el plano Z cada 1 μm de espesor desde el fondo del cubreobjetos hasta el ápice superior de las células. La longitud de excitación fue de 440 nm y la de emisión de 480 nm. Se adquirieron sucesivas series Z cada 10 min durante un periodo de 2 h. En un único experimento, la imagen se amplió para mostrar una única célula y las imágenes se tomaron cada 15 min durante un periodo de 45 min. Las imágenes se registraron con la ayuda del software Leica Application Suite AF 1.8.1 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) y se procesaron cuando fue necesario con Image J, version 1.42Q (NIH, USA).

3.10.- Materiales y soluciones.

El medio DMEM, la albúmina de suero bovina y el suero fetal bovino se compraron a Gibco (Madrid, España); las toxinas ω -conotoxina-GVIA y agatoxina-IVA las suministró Peptide Institute (Japón); la sonda Fluo-4 y la sonda ouabaína-Bodipy-FL se adquirieron de Molecular Probes/Invitrogen (Carlsbad, CA, USA); todos los demás reactivos se adquirieron de Sigma (Madrid, España).

3.11.- Análisis de los datos.

Los datos estadísticos se muestran como la media \pm error estándar (e.e.) para cada grupo de experimentos. Para los análisis de significación estadística, se comprobó la normalidad de los datos mediante un test Kolmogorov-Smirnov antes de aplicar el test de la “t” de Student o ANOVA

Si los datos no cumplieron la condición de normalidad, se usaron las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney para comparar dos muestras y el ANOVA de rangos de Kruskal-Wallis. En caso de hallar diferencias significativas, se utilizó la prueba *post-hoc* de Dunn de comparaciones múltiples contra grupo control. Las pruebas estadísticas fueron realizadas con el software Sigmastat 3.0 (Carlsbad, CA, USA) o MS Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Un valor de *p* igual o menor de 0’05 se consideró el límite de la significación estadística.

IV. Resultados

*Las figuras me engañan con frecuencia, especialmente cuando soy yo el que
las ha creado.
Mark Twain*

4.1.- Efecto de ouabaína 10 μ M sobre la exocitosis estimulada con pulsos de 35 mM K^+ (35K⁺)

4.1.1.- Caracterización del efecto de ouabaína sobre las respuestas secretoras inducidas por 35 K^+

Las células cromafines liberan catecolaminas mediante un proceso exocitótico en respuesta a la despolarización de la membrana y la consiguiente entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. Fisiológicamente, este proceso acontece durante el potencial de acción iniciado por la unión de la acetilcolina a receptores nicotínicos de la membrana. En condiciones *in vitro*, podemos inducir la despolarización de la membrana utilizando soluciones iónicas ricas en K^+ . La alteración de los gradientes iónicos provoca la apertura de CCDV y la entrada masiva de Ca^{2+} al interior celular, produciéndose así la liberación de catecolaminas durante el proceso de fusión de la membrana vesicular con la membrana citoplasmática.

La inducción de la exocitosis utilizando pulsos de K^+ nos permite estudiar el fenómeno exocitótico centrándonos en la apertura de CCDV y acontecimientos siguientes obviando la influencia de la corriente nicotínica.

4.1.1.1.- Estudio de la potenciación ouabaínica mediante amperometría en poblaciones de células.

Para establecer unas condiciones control sobre las que estudiar el fenómeno de potenciación de la exocitosis provocado por ouabaína, indujimos una despolarización moderada de la membrana plasmática a poblaciones de células atrapadas en una microcámara mediante la perfusión de una solución isoosmótica rica en K^+ (sustitución de 35 mM NaCl con 35 mM KCl) con un protocolo de pulsos breves de 10 segundos aplicados cada 3 minutos. El eluyente se hizo pasar por un detector amperométrico que registró en tiempo real la cantidad de catecolaminas liberadas. Tras probar con distintas concentraciones de K^+ , elegimos la concentración de 35 mM K^+ (35K⁺), que provoca una despolarización moderada de la membrana, como óptima para nuestro estudio. Esta concentración provoca una respuesta secretora de magnitud considerable, pero no agota

la capacidad exocitótica de la célula permitiendo la realización de protocolos de más de una hora de duración.

La figura 10A muestra un registro original de exocitosis medida por amperometría en poblaciones de células. El valor absoluto de la respuesta secretora a $35K^+$ varía ampliamente entre distintos experimentos, hecho que atribuimos a la variabilidad intercultivos y a la preparación y fijación manual de las células en la camarita de perfusión. Sin embargo, el perfil de la respuesta fue reproducible, observándose en la mayoría de los experimentos una moderada disminución de la secreción a lo largo del tiempo.

La adición de ouabaína a la solución de perfusión provoca un incremento gradual de la respuesta secretora a $35K^+$. En protocolos similares a los de la Fig 10B, se dieron de tres a cinco pulsos control de $35K^+$ (utilizados para la posterior normalización de las respuestas) y se añadió ouabaína a una concentración de $10\ \mu M$. Las respuestas aumentaron en magnitud respecto a los controles a los 10-20 minutos de la adición del fármaco. El aumento progresivo de la secreción se mantuvo hasta 45 minutos después de la adición de ouabaína, momento en el que la respuesta se estabilizó en la mayoría de los experimentos y cayó levemente en algunos.

La figura 10C muestra valores estadísticos de secreción normalizados respecto a los tres primeros pulsos de $35K^+$. En un total de 9 experimentos, concluimos que la respuesta secretora en experimentos control cae hasta un $72.9 \pm 12.8\%$ a lo largo de una hora de estimulación con $35K^+$. En los experimentos con $10\ \mu M$ de ouabaína, la respuesta exocitótica aumentó hasta un $178 \pm 21\%$ del control en los 45 minutos de exposición al fármaco en un total de 20 experimentos.

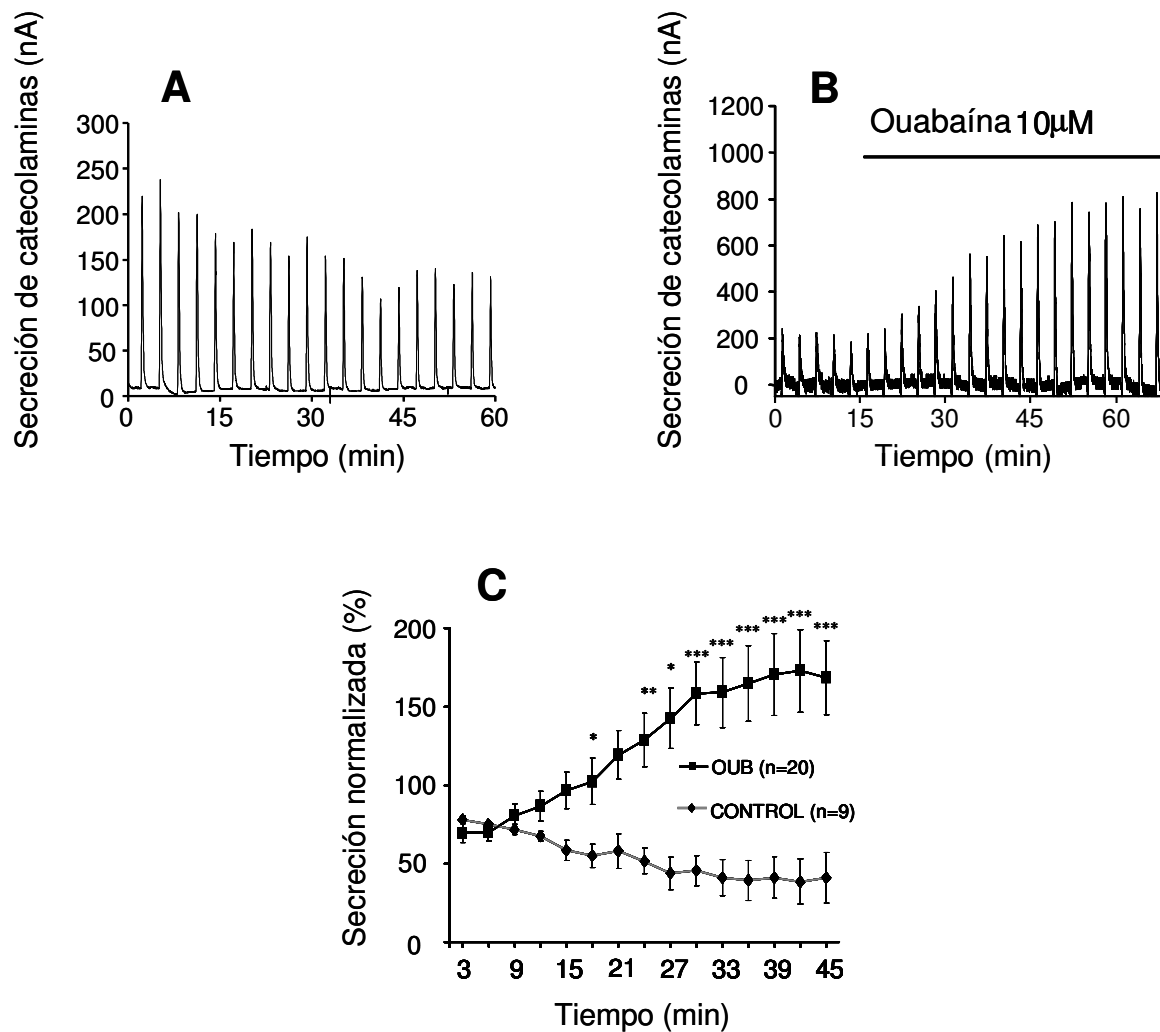


Fig. 10.- Efecto de ouabaína sobre la secreción de catecolaminas en CCB estimuladas con pulsos sucesivos de 35 mM K^+ de 10 s de duración aplicados cada 3 min. (A) Ejemplo de respuestas secretoras inducidas por pulsos de 35 mM K^+ . Las células cromafines se colocaron en una camarita y se perfundieron con las distintas soluciones del experimento (v. apartado 3.2). La ordenada refleja la secreción de catecolaminas medida en tiempo real con un detector amperométrico en nA. Las respuestas mostraron una ligera tendencia a disminuir con el tiempo de estimulación. (B) En un protocolo como el anterior, se adicionó 10 μ M de ouabaína tras 3-4 pulsos control. Las respuestas aumentaron progresivamente a lo largo del tiempo del experimento, estabilizándose aproximadamente a los 30 minutos de perfusión con el fármaco. (C) Curso temporal de la respuesta secretora normalizada respecto a la media de los tres pulsos anteriores a la adición de ouabaína en 9 experimentos control y 20 experimentos en presencia de ouabaína. Los datos se muestran como media \pm e.e. La significación estadística se evaluó mediante un test de ANOVA (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

4.1.1.2.- Estudio de la potenciación ouabaínica mediante amperometría en célula única.

Los resultados de los experimentos anteriores sugieren que, en presencia de ouabaína, un mayor número de vesículas sufren exocitosis con cada pulso de K^+ , aunque también pueden explicarse por una mayor liberación de catecolaminas almacenadas en el mismo número de vesículas. Para despejar esta incógnita, utilizamos la técnica de amperometría en célula única que nos permite visualizar la secreción de vesículas individuales. Se dieron pulsos breves de 24 mM K^+ (en 2 mM Ca^{2+}) o de 5 mM Ba^{2+} (en sustitución por el Ca^{2+}). Los pulsos fueron de 10 s de duración aplicados cada 30 s en células control (n=12) y en células preincubadas (durante 20 min) con 10 μ M de ouabaína (n=11). En estos experimentos se han calculado parámetros globales de secreción (número y frecuencia de espigas; Fig. 11) como parámetros de espigas individuales (I_{max} , $t_{1/2}$, Q). Podemos observar que en presencia de ouabaína aumenta el

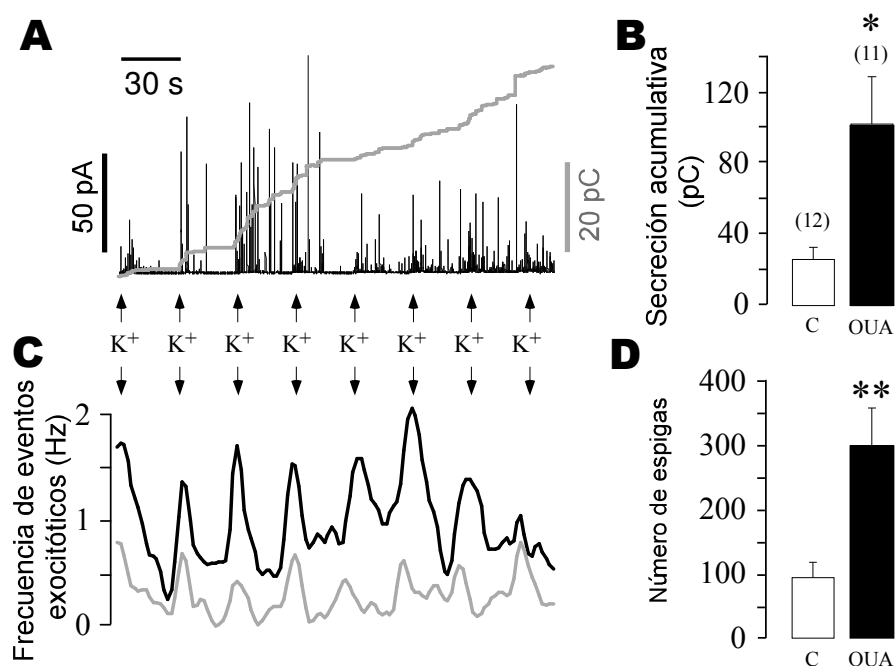


Fig. 11.- Respuestas secretoras a 24 K^+ en células cromafines bovinas estudiadas con amperometría en célula única. (A). Ejemplo de registro amperométrico obtenido de una célula cromafin aislada estimulada durante 10 s con 24 mM K^+ a intervalos de 30 s (flechas negras en la parte inferior de la figura). Cada espiga representa la liberación de catecolaminas de una única vesícula. (B) Valores medios de secreción acumulativa de 12 células control y 11 preincubadas 30 min con 10 μ M de ouabaína. La secreción acumulativa se midió durante dos minutos tras el estímulo. (C) El análisis de la frecuencia de las espigas amperométricas muestra un aumento en el número de eventos exocitóticos asociados al estímulo secretagogo en células preincubadas durante 20 min con ouabaína (línea negra) respecto a control (línea gris). (D) Gráfico de barras que muestra el número de eventos exocitóticos registrados durante dos minutos de registro. El análisis estadístico se realizó usando el test “t” de Student; * p <0.05 ** p <0.01.

número de eventos exocitóticos sin verse afectada la carga cuantal ni los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas (Fig. 12), indicando un mayor número de vesículas fusionándose en la membrana plasmática.

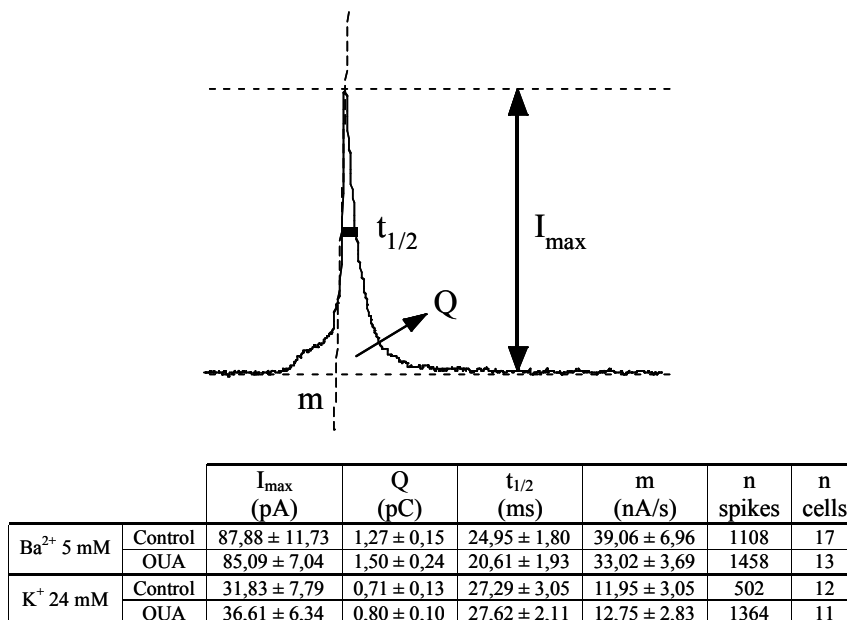


Fig. 12.- (A) El dibujo describe una espiga amperométrica y los parámetros cinéticos medidos: “ I_{\max} ” es la corriente máxima causada por la oxidación de catecolaminas que alcanzan el electrodo; “ $t_{1/2}$ ” es la anchura de la espiga a la mitad de su altura; “Q” es el área bajo la curva de la espiga que indica la cantidad total de catecolaminas liberadas durante el evento exocitótico; “m” es la pendiente de ascensión de la espiga, calculada sobre el 25 y 75% de la I_{\max} . (B) Tabla de datos que muestra los valores de los parámetros cinéticos (media \pm e.e.) para las espigas secretoras de células pretratadas durante 20 min con 10 μ M de ouabaína (OUA) y de células control sin tratar, estimuladas con 24 mM K⁺ ó 5 mM Ba²⁺. Ninguno de los parámetros cinéticos estudiados tuvo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y OUA.

4.1.2.- Efecto de ouabaína sobre el potencial de membrana en reposo y despolarización inducida por pulsos de K⁺

Trabajos previos han descrito una acción despolarizante de la ouabaína en otros modelos celulares (Jones, 1989; Lamas y col., 2002). Cambios en el potencial de membrana en reposo (E_m) pueden alterar la excitabilidad y funcionalidad de canales iónicos de membrana voltaje-dependientes, viéndose afectada la exocitosis inducida por K⁺. Para comprobar si en nuestras condiciones de trabajo la ouabaína podía modificar el patrón de despolarización ante pulsos de K⁺, realizamos medidas del potencial de membrana en células cromafines bovinas valiéndonos de la técnica de patch-clamp en la modalidad de fijación de corriente.

La figura 13A muestra dos registros de potencial de membrana. Mediante una pipeta multicanal situada próxima a la célula, se perfundieron soluciones enriquecidas en K^+ (35 y 100 mM) en los tiempos indicados. Posteriormente se perfundió ouabaína a las concentraciones de 10 y 100 μM durante 120 s para después aplicar nuevos pulsos de $35K^+$ y $100K^+$.

La introducción de soluciones con 35 y 100 mM K^+ produjo un rápido efecto despolarizante. La despolarización revirtió instantáneamente al retirar la solución con alto K^+ . La concentración de 100 μM de ouabaína produjo un ligero cambio en el potencial de reposo ($\Delta E_m = 11.2 \pm 1.4$ mV) medido tras 120 segundos de la aplicación del fármaco, mientras que no se observaron cambios con 10 μM . La despolarización inducida por 35 y 100 mM K^+ no se afectó en ningún caso por la presencia de ouabaína. La figura 13B muestra un resumen estadístico de estos datos para un total de 12 experimentos, 6 con 10 μM de ouabaína y 6 con 100 μM de ouabaína.

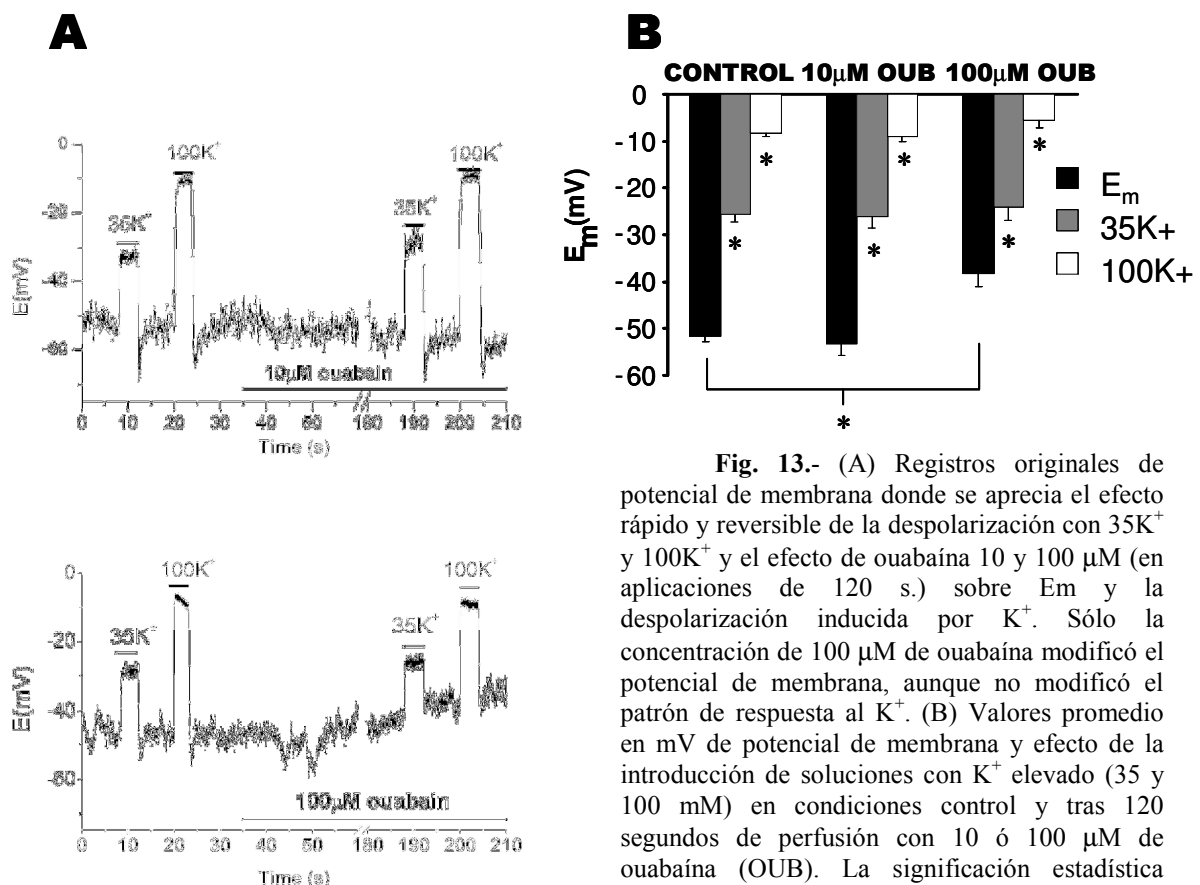


Fig. 13.- (A) Registros originales de potencial de membrana donde se aprecia el efecto rápido y reversible de la despolarización con $35K^+$ y $100K^+$ y el efecto de ouabaína 10 y 100 μM (en aplicaciones de 120 s.) sobre E_m y la despolarización inducida por K^+ . Sólo la concentración de 100 μM de ouabaína modificó el potencial de membrana, aunque no modificó el patrón de respuesta al K^+ . (B) Valores promedio en mV de potencial de membrana y efecto de la introducción de soluciones con K^+ elevado (35 y 100 mM) en condiciones control y tras 120 segundos de perfusión con 10 ó 100 μM de ouabaína (OUB). La significación estadística obtenida mediante una prueba "t" de Student se representa mediante asteriscos (* $p < 0.05$)

4.1.3.- Efecto de los bloqueantes de canales de calcio en la potenciación por ouabaína de la secreción inducida por pulsos de K^+

Los CCDV juegan un papel crucial en la secreción de catecolaminas inducida por K^+ . Ya que sus propiedades biofísicas, funcionales y farmacológicas presentan diferencias, consideramos la posibilidad de que en el proceso de potenciación inducido por la ouabaína, algún subtipo de canal poseyese mayor relevancia que los otros. En glándula adrenal intacta de gato, el modulador de CCDV tipo L BayK8644, aumenta notablemente el efecto de ouabaína usando un protocolo de reintroducción de Ca^{2+} (Esquerro y col., 1980). Para probar esta hipótesis, añadimos bloqueantes selectivos de los distintos subtipos de CCDV a las soluciones de trabajo en experimentos similares a los de la Fig. 10B.

La perfusión continua de nifedipino (3 μ M) nos permitió realizar el experimento sin la intervención de los canales tipo L (Fig. 14A). Por otra parte, para aislar los canales L, utilizamos la preincubación durante 15 minutos con 1 μ M de ω -conotoxina-GVIA (GVIA) y agatoxina-IVA (Aga-IVA) que bloquean irreversiblemente los canales N y P/Q respectivamente (Fig. 14B).

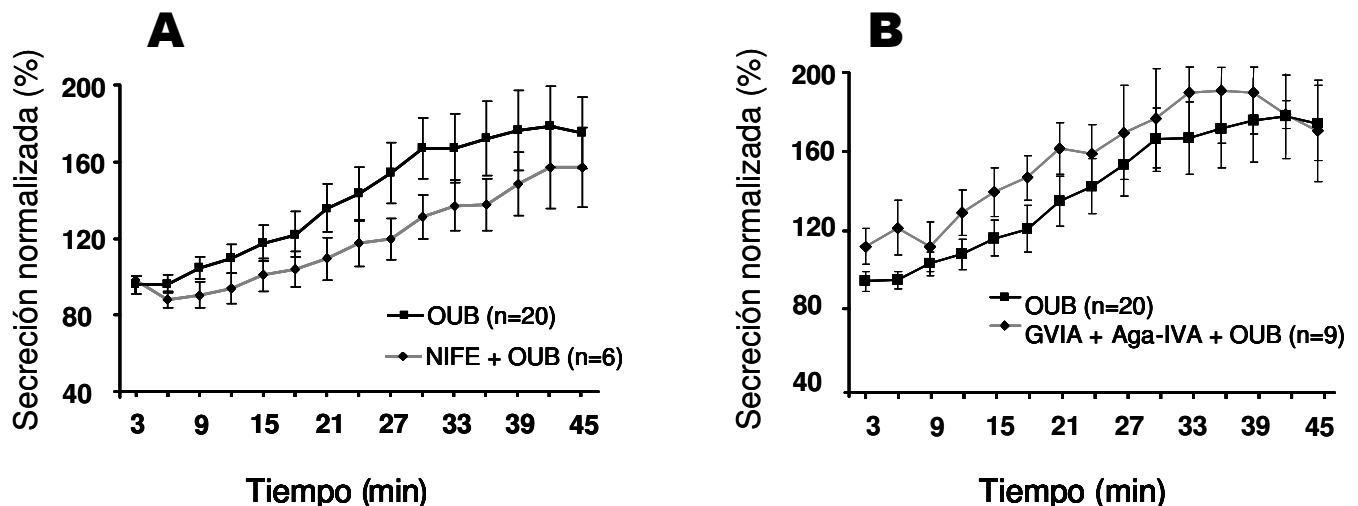


Fig. 14.- Efecto de los bloqueantes de CCVD L y no-L en la PPO. Se muestran valores estadísticos de secreción normalizada (media \pm e.e.) respecto al tiempo desde la adición de 10 μ M de ouabaína en experimentos control con ouabaína (OUB) respecto a nifedipino (3 μ M) con ouabaína (10 μ M) (NIFE + OUB) (A) y la combinación de GVIA (1 μ M) y Aga-IVA (1 μ M) con ouabaína (10 μ M) (GVIA + Aga-IVA + OUB) (B). El número de experimentos para cada grupo se indica entre paréntesis. El análisis estadístico mediante un test de ANOVA no arrojó diferencias significativas entre los grupos.

Ninguno de los CCVD parece tener una participación estadísticamente significativa sobre el aumento de la secreción de catecolaminas inducida por K^+ en presencia de 10 μM de ouabaína. Sin embargo, es de notar una ligera tendencia a disminuir en los experimentos con nifedipino, mientras que aumenta cuando sólo el canal L está funcional.

4.1.4.- Efecto de KB-R7943 en la potenciación por ouabaína de la secreción inducida por pulsos de K^+

Un efecto demostrado de la inhibición de la bomba Na^+/K^+ por glucósidos cardiotónicos es la activación del modo reverso del intercambiador Na^+/Ca^{2+} del plasmalema, que compensa el incremento de $[Na^+]_i$ generado por ouabaína mediante la introducción de Ca^{2+} desde el medio extracelular (García y col., 1981; Esquerro y col., 1980).

Este fenómeno podría explicar, al menos en parte, los efectos potenciadores sobre la secreción de ouabaína en células cromafines. En experimentos como el de la Fig. 15A, la adición de KB-R7943, un inhibidor del NCX en modo reverso a una concentración de 3 μM , abolió la potenciación inducida por ouabaína de forma reversible. Este fármaco tiene acciones inhibitoras sobre la secreción de catecolaminas,

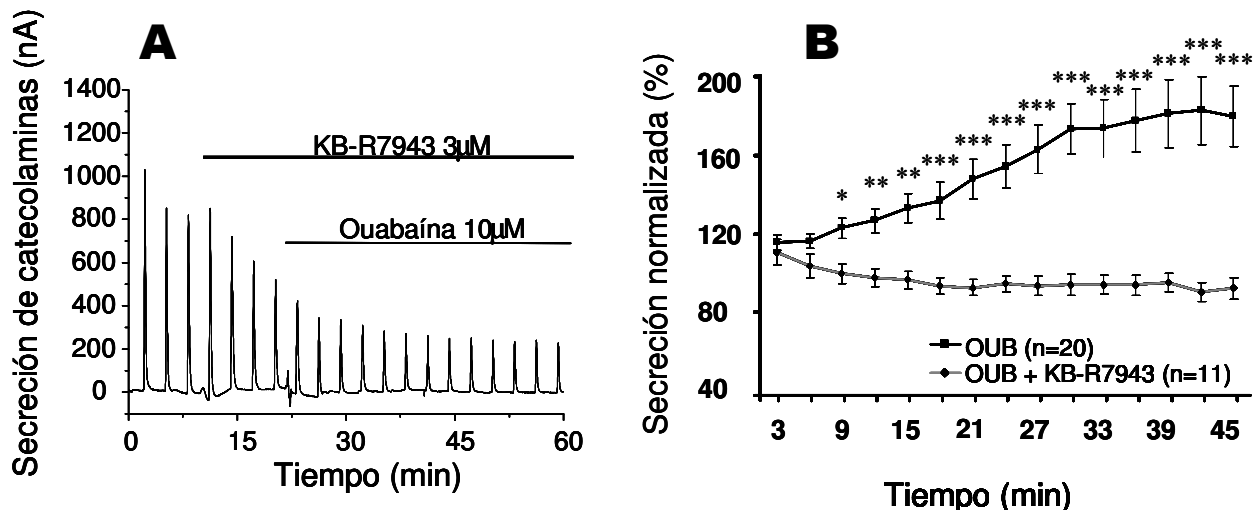


Fig. 15.- Efecto de KB-R7943 sobre la potenciación inducida por ouabaína. (A) Registro original de secreción en poblaciones donde se observan los efectos de la aplicación secuencial de KB-R7943 y ouabaína a las dosis indicadas. (B) Valores normalizados de secreción (media \pm e.e.) para los pulsos posteriores a la adición de 10 μM de ouabaína en experimentos con ouabaína sola (OUB; n=20) y previa incubación con KB-R7943 (OUB + KB-R7943; n=11). En estos últimos experimentos, se eliminó el efecto potenciador de ouabaína. La significación estadística obtenida mediante un test ANOVA se muestra con asteriscos (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

por lo que se dieron 4-5 pulsos control tras su adición y se normalizó la acción de ouabaína con respecto al valor de secreción en presencia del fármaco. En la Fig. 15B se muestra el curso temporal de la secreción desde la adición de ouabaína en ausencia (n=20) y presencia de KB-R7943 (n=11). La adición de KB-R7943 convierte la curva de potenciación en una línea similar al control de secreción con $35K^+$.

La acción inhibidora de la secreción, que en nuestro modelo redujo la respuesta inicial a $70'1 \pm 6'7\%$, podría deberse a un efecto bloqueante de CCDV. Se realizaron experimentos de medida de corriente de Ca^{2+} con la técnica de patch-clamp y no se encontró bloqueo de la corriente a la dosis que elimina la potenciación de la secreción inducida por ouabaína (Fig. 16).

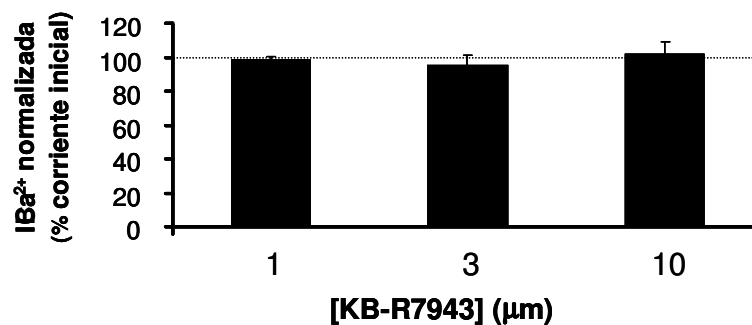


Fig. 16.- Efecto de KB-R7943 sobre la I_{Ba} en CCB. Se midió la corriente generada por pulsos despolarizantes de -70 a -10 mV de 50 ms de duración cada 30 s usando 10 mM Ba^{2+} como catión de carga. A las concentraciones estudiadas (1, 3 y 10 µM) KB-R7943 no bloqueó la I_{Ba} en un total de 4 experimentos para cada grupo. Se muestra la media \pm e.e. de la corriente normalizada a los 120 s de adición del fármaco.

4.1.5.- Efecto de tapsigargina, 2-APB y cafeína sobre la potenciación por ouabaína de la secreción inducida por pulsos de $35K^+$

Sabemos que el Ca^{2+} del retículo está implicado de forma directa en el proceso secretor y en la síntesis, maduración y transporte de vesículas exocitóticas. La movilización de Ca^{2+} reticular podría ser por tanto un factor que explicase, al menos en parte, la potenciación por ouabaína sobre pulsos de K^+ . Esta hipótesis de movilización de Ca^{2+} intracelular por glucósidos cardiotónicos está validada en cardiomiocitos y células del túbulo proximal renal (Blaustein, 1993; Aizmann y col, 2001). Asimismo,

ciertos autores han descrito en estas estirpes celulares y en células cromafines una colocalización entre la bomba Na^+/K^+ , el retículo endoplásmico y el NCX, estructura esta última que ya hemos asociado con la potenciación de la secreción inducida por ouabaína. La proximidad entre estas estructuras ha llevado a sugerir la teoría del plasmerosoma, lugares de unión espacial y funcional entre la membrana plasmática y el retículo endoplásmico donde se forman microdominios donde la concentración de iones puede variar ampliamente sin verse modificada la concentración global en el citosol. Esta teoría permite explicar porqué la ouabaína y sustancias similares pueden activar el modo reverso del intercambiador sin cambios aparentes en la $[\text{Na}^+]_c$.

Para conocer la implicación del Ca^{2+} del retículo en la potenciación inducida por ouabaína utilizamos varias herramientas farmacológicas dirigidas contra las principales estructuras de entrada y salida de Ca^{2+} en el RE y encontramos que todas ellas eran capaces de anular en buena medida el efecto de ouabaína sobre la secreción de catecolaminas.

a) Efecto de tapsigargina sobre la potenciación por ouabaína de la secreción inducida por pulsos de K^+ .

Se estimularon poblaciones de células cromafines bovinas con pulsos de 35K^+ de 10 s de duración cada 3 min. Tras 3-4 pulsos control, se adicionó $1\text{ }\mu\text{M}$ de tapsigargina, un inhibidor irreversible de la SERCA (Lytton y col., 1991). Este fármaco bloquea la entrada de Ca^{2+} en el RE y provoca su vaciado de forma indirecta. Como se observa en la Fig 17A, el fármaco bloquea parcialmente la secreción de catecolaminas ($43'1 \pm 3'1\%$ de la respuesta inicial). A los 10 minutos de adición de tapsigargina, se añadió ouabaina ($10\text{ }\mu\text{M}$) a las soluciones de perfusión. La figura 17B muestra datos estadísticos normalizados para un total de 11 experimentos comparando el efecto de $10\text{ }\mu\text{M}$ de ouabaina con y sin tapsigargina. Obsérvese que la ouabaína no fue capaz de potenciar las respuestas secretoras en células tratadas con tapsigargina.

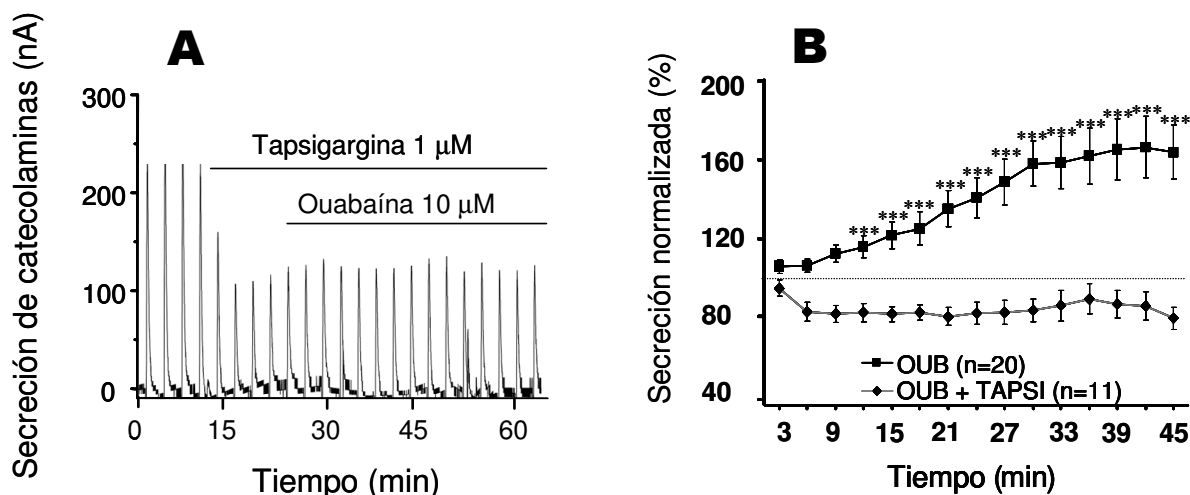


Fig. 17.- Efecto de tapsigargina sobre la potenciación de la liberación de catecolaminas inducida por ouabaína. (A) Registro original de amperometría en poblaciones siguiendo un protocolo de estimulación con pulsos de 10 s de 35K⁺ cada 3 min. Los fármacos tapsigargina (1 μM) y ouabaína (10 μM) fueron añadidos durante el periodo de tiempo representado por las barras horizontales. La tapsigargina produjo una caída de la señal exocitótica que se estabilizó a los 3-4 pulsos de perfusión. La ouabaína, añadida sobre la tapsigargina, no fue capaz de potenciar la exocitosis. (B) Valores normalizados para un total de 20 experimentos con ouabaína y 11 con la combinación ouabaína más tapsigargina. La significación estadística obtenida mediante un test de ANOVA se muestra con asteriscos (***) $p < 0.001$.

b) Efecto de cafeína sobre la potenciación por ouabaína de la secreción inducida por pulsos de K⁺.

En experimentos similares a los anteriores, añadimos a la solución de perfusión 20 mM de cafeína, que actúa como agonista de los RyR y provoca una salida de Ca²⁺ del RE que acaba vaciando el depósito (Alonso y col., 1999, rev). Frecuentemente, la cafeína originó una respuesta exocitótica por sí misma. Como se observa en la Fig. 18A, la perfusión continua de cafeína deprime la respuesta secretora a 35K⁺ (58'1±8'4% de la respuesta inicial). Una vez estabilizada la respuesta en presencia de cafeína, se adicionó ouabaína (10 μM) a la solución de perfusión. En ninguno de los 9 experimentos realizados se observó potenciación de la respuesta. Como puede verse en el análisis estadístico de la Fig. 18B, la combinación de ouabaína y cafeína mantuvo estables las respuestas secretoras a 35K⁺, que no decayeron con el tiempo como ocurre en los controles de secreción evocada por pulsos repetitivos de 35K⁺ (v. Figs. 10A y 10C).

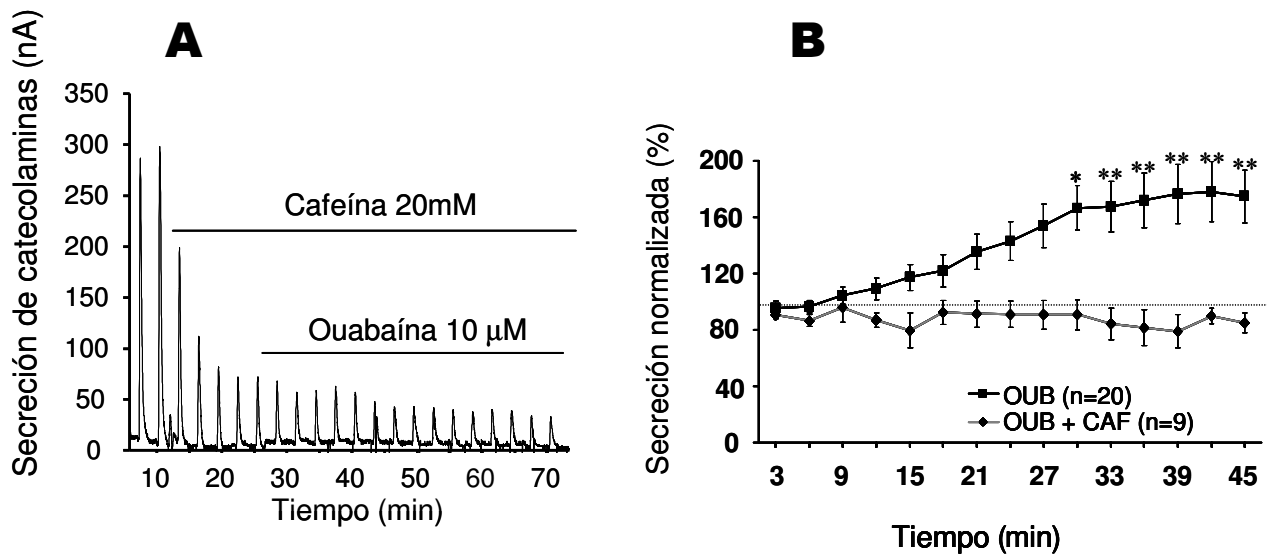


Fig. 18.- El efecto potenciador de ouabaína sobre la secreción inducida por $35K^+$ se abole en presencia de 20 mM de cafeína. (A) Registro original de amperometría en poblaciones. Las respuestas a $35K^+$ en un protocolo de 10 s de estimulación cada 3 minutos se inhiben en la presencia continua de 20 mM de cafeína. La posterior adición de 10 μM de ouabaína no provocó potenciación de la secreción de catecolaminas. (B) Valores estadísticos de secreción normalizada (media \pm e.e.) respecto a los tres pulsos anteriores a la adición de ouabaína en experimentos con ouabaína sola (n=20) y ouabaína en presencia de cafeína (n=9). La significación estadística obtenida mediante un test de ANOVA, se muestra con asteriscos (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

c) Efecto de 2-APB sobre la potenciación por ouabaína de la secreción inducida por pulsos de K^+ .

La Fig. 19A reproduce un registro de amperometría en el que se muestra cómo la adición de 2-APB, bloqueante de los IP_3R , a una concentración de 10 μM, generó una caída de la respuesta secretora a pulsos de $35K^+$ de magnitud similar a lo observado con cafeína y tapsigargina ($64.7 \pm 7.0\%$ de la respuesta inicial). Tras 3-4 pulsos en presencia de 2-APB, se adicionó ouabaína (10 μM) que, en contra de lo que ocurre en ausencia del bloqueante de los IP_3R , no potenció las respuestas secretoras. Tampoco se observó la típica caída de la respuesta secretora de los experimentos control (v. Figs. 10A y 10C). La Fig. 19B muestra un análisis estadístico de un total de 13 experimentos donde se muestra el curso temporal de la secreción normalizada respecto a los tres pulsos previos a la adición de ouabaína, en presencia y ausencia de 2-APB.

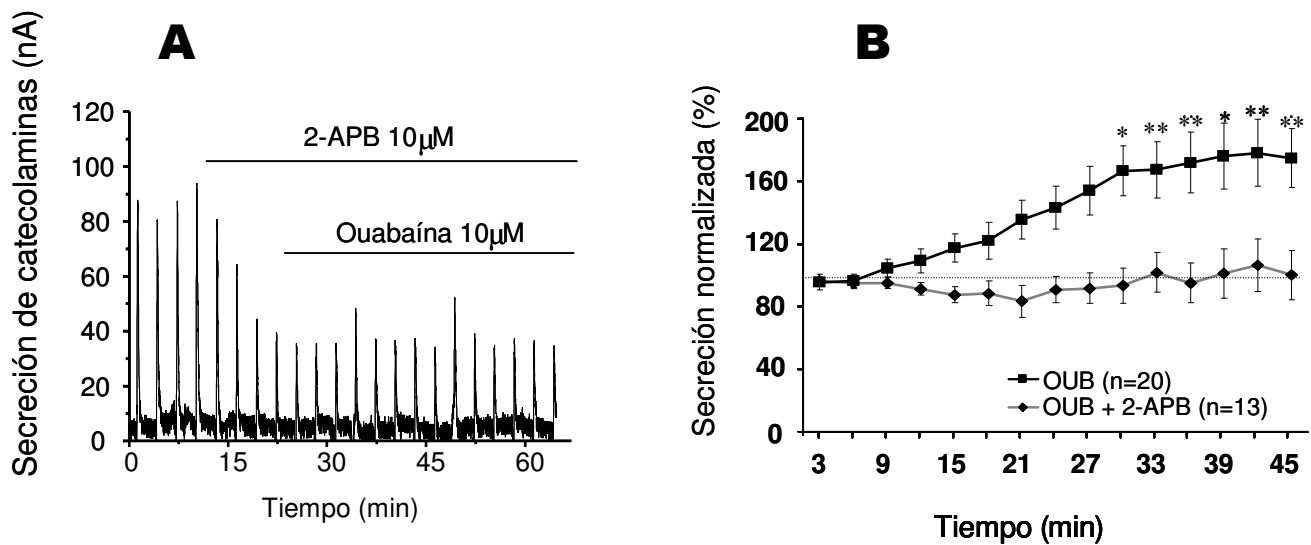


Fig. 19.- El 2-APB bloquea el efecto potenciador de ouabaína sobre la secreción inducida por K⁺. (A) Registro original de secreción de catecolaminas en poblaciones de CCB estimuladas con 35K⁺ (10 s cada 3 min). La adición de 2-APB (10 μM) provocó una caída de la respuesta secretora. La posterior perfusión de 10 μM de ouabaína no provocó potenciación de la señal exocitótica. (B) Comparativa estadística (media ± e.e. de la secreción normalizada respecto a los tres pulsos previos a ouabaína) del efecto de ouabaína en ausencia (n=20) y presencia de 2-APB (10 μM) (n=13). La significación estadística (p<0.05) obtenida mediante un test de ANOVA se muestra con asteriscos (*p<0.05; **p<0.01).

4.1.6.- Efecto de queleritrina sobre la potenciación por ouabaína de la secreción inducida por pulsos de K⁺.

La proteínaquinasa C (PKC) es una subfamilia de enzimas citosólicas que transducen señales bioquímicas iniciadas por la hidrólisis de lípidos de membrana. En concreto, se regula por diacilglicerol (DAG) y también por Ca²⁺. Además de su papel en el crecimiento y la diferenciación celulares, se ha asociado con el transporte y migración de vesículas a la membrana plasmática (Eguigaray, 2008, Tesis Doctoral)

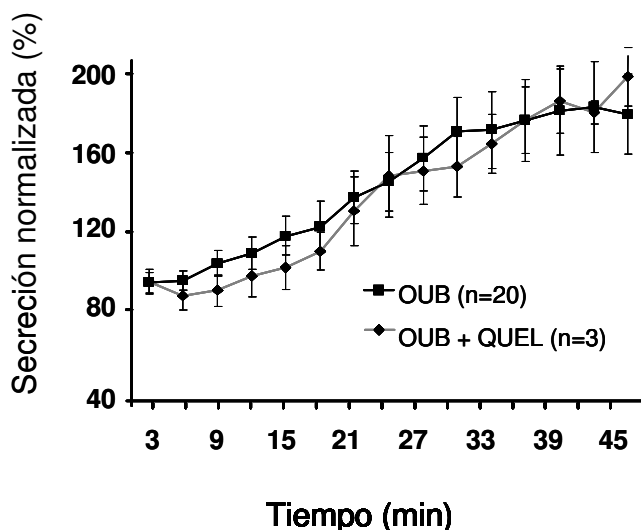


Fig. 20.- El perfil de potenciación de la secreción por ouabaína (10 μM) sobre pulsos de 35K⁺ no se vio modificado por la adición previa de 3 μM de queleritrina. Las curvas muestran los valores estadísticos (media ± e.e.) de secreción normalizada para experimentos con ouabaína (OUB; n=20) y ouabaína con queleritrina (OUB + CHEL; n=3). El análisis de significación mediante un test de ANOVA no encontró diferencias estadísticas entre los grupos.

La acción de la PKC sobre los depósitos de vesículas podría explicar el efecto potenciador de la secreción inducido por ouabaína, que aparentemente supone una mayor cantidad de vesículas disponibles para ser exocitadas. Por ello realizamos experimentos con un protocolo similar a los anteriores en los que se añadió queleritrina, un inhibidor selectivo de la PKC (Herbert y col., 1990), a la solución de perfusión previo a la adición de ouabaína. Como se observa en el análisis estadístico normalizado de la Fig. 20, en los 3 experimentos realizados con la combinación de queleritrina y ouabaína, no se modificó el perfil potenciador respecto a los experimentos con ouabaína sola (n=20)

4.2.- Efecto de ouabaína sobre la exocitosis estimulada por salida de Ca^{2+} reticular inducida por cafeína e histamina.

4.2.1.- Extinción de la respuesta secretora con pulsos repetidos de cafeína e histamina. Efecto regenerador de ouabaína.

Existen al menos dos canales de salida de Ca^{2+} del RE en las células cromafines bovinas: el receptor de rianodina (RyR) y el de IP_3 (IP_3R). La cafeína es un agonista de los canales de rianodina (RyR) del RE y la histamina se une a receptores histaminérgicos de la membrana y genera una cascada de segundos mensajeros (Marley y col., 2003; Garcia y col., 2006) que desemboca en la activación del receptor de IP_3 del RE.

En los siguientes experimentos, estimulamos la salida de calcio reticular con los secretagogos cafeína e histamina y después perfundimos ouabaína durante 20 minutos. Registramos la respuesta secretora que estos estímulos provocaron en poblaciones de células cromafines bovinas, de forma análoga a los experimentos previos con 35K^+ .

La figura 21 muestra dos registros típicos obtenidos al estimular poblaciones de células cromafines bovinas con pulsos de 10 segundos de histamina (100 μM) (Fig. 21A) o cafeína (20 mM) (Fig 21B). Puede observarse en ambos casos un fuerte declive

de la respuesta secretora con la aplicación de pulsos repetidos. A los 15 minutos de estimulación, la respuesta se redujo al $44'9 \pm 2'07\%$ ($n=8$) en el caso de los pulsos con histamina y al $17'5 \pm 1'4\%$ ($n=9$) cuando se estimulaba con cafeína. La introducción de ouabaína ($10 \mu\text{M}$) tras 6 pulsos de histamina o cafeína logró recuperar la respuesta exocitótica desensibilizada. El efecto se hizo evidente en los primeros pulsos tras la adición del fármaco. A los 30 minutos, la respuesta secretora control se recuperó totalmente, al $108'3 \pm 11'1\%$ de la respuesta inicial utilizando pulsos de histamina y al $116'9 \pm 4'7\%$ con pulsos de cafeína.

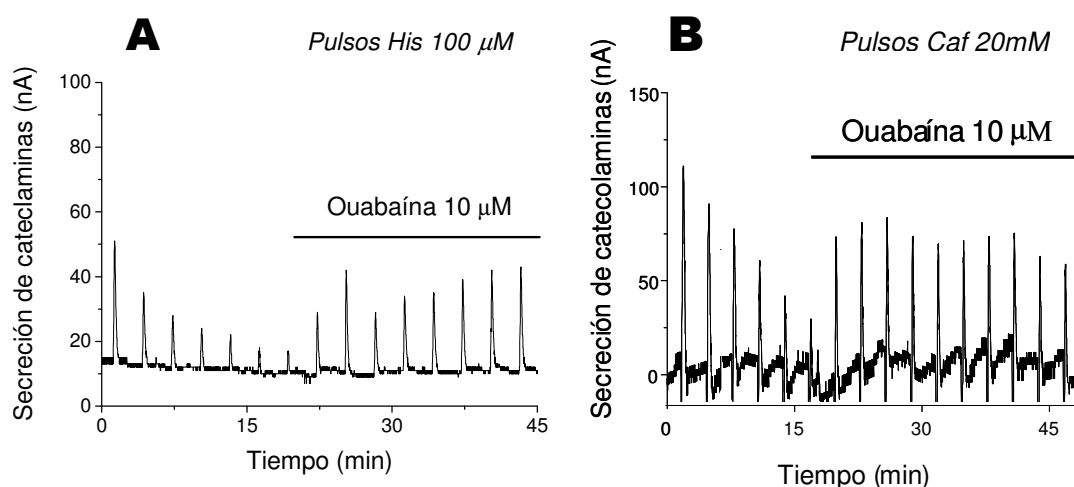


Fig. 21.- Se muestran registros originales de secreción en poblaciones de CCB por estimulación con pulsos intermitentes de histamina (His) $100 \mu\text{M}$ (A) o de cafeína (Caf) 20 mM (B). Las respuestas se desensibilizaron paulatinamente con la estimulación repetida. Tras 6-7 pulsos con el secretagogo indicado, se añadió ouabaína ($10 \mu\text{M}$), que en ambos casos restauró rápidamente la respuesta exocitótica a sus valores iniciales.

4.2.2.- Estudio del mecanismo de acción de la recuperación de la respuesta exocitótica a histamina inducida por ouabaína

Probamos una batería de fármacos que bloquean dianas potenciales de la acción de la ouabaína con un planteamiento similar al de los experimentos realizados con pulsos de K^+ . Se introdujeron los distintos fármacos junto con la ouabaína en experimentos como el mostrado en la figura 10A. En la figura 22 se muestran los resultados normalizados respecto al primer pulso de $100 \mu\text{M}$ de histamina, la caída de la respuesta a los 15 minutos de estimulación, y la recuperación de la misma a los 5 y 30 minutos de introducción de los fármacos.

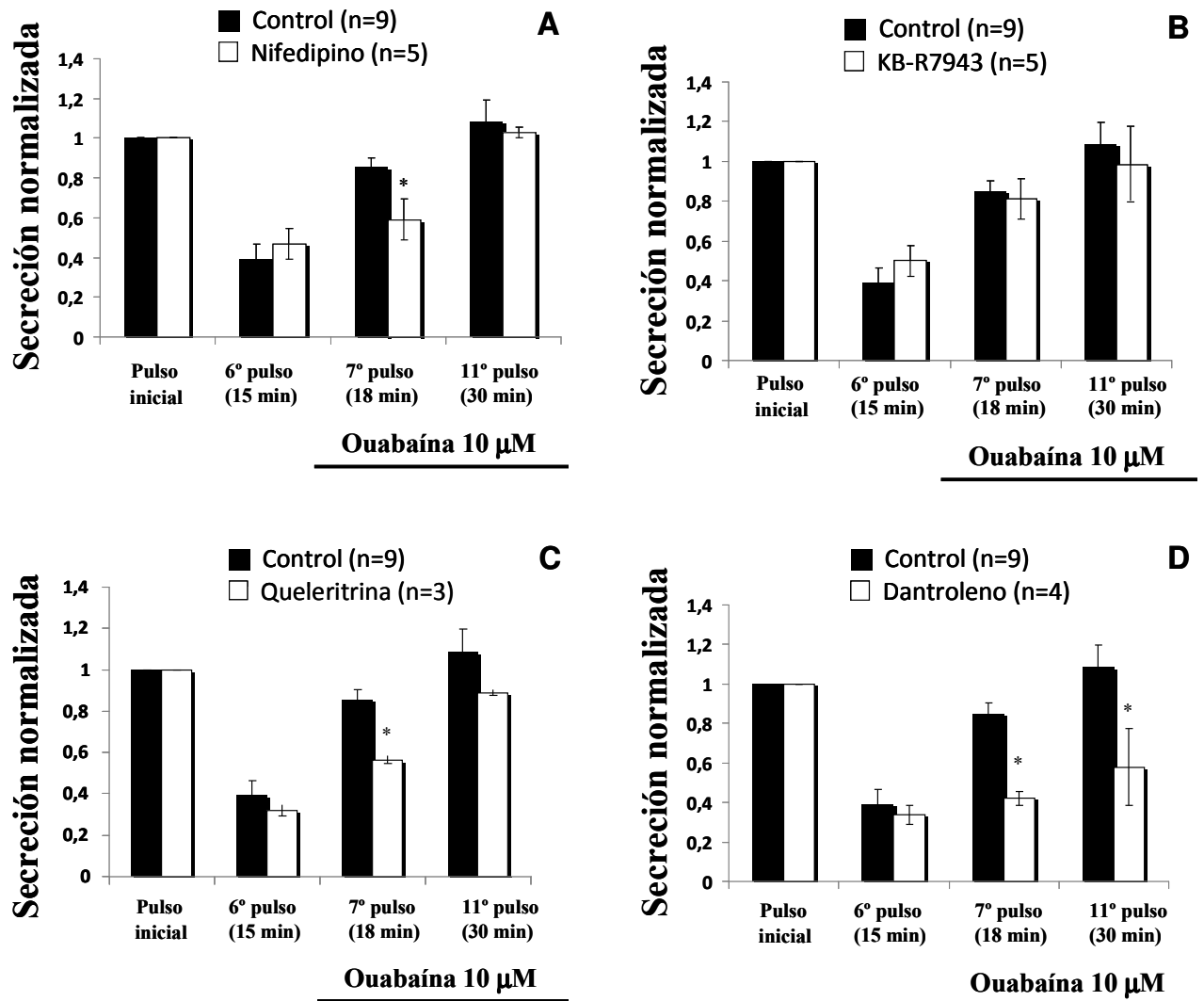


Fig 22.- Efecto de nifedipino 3 μ M (A), KB-R7943 3 μ M (B), queleritrina 3 μ M (C) y dantroleno 10 μ M (D) en coaplicación con ouabaína 10 μ M sobre la regeneración de la respuesta exocitótica a pulsos repetidos de histamina 100 μ M. Las barras muestran valores estadísticos de secreción (como media \pm e.e.) normalizados respecto al pulso inicial para experimentos como el de la fig. 21A (control, barras negras) o con coaplicación de ouabaína y el fármaco problema (barras blancas). El número de experimentos para cada serie se indica entre paréntesis. La significación estadística obtenida mediante el test t de Student se muestra con asteriscos (* p <0'05).

Utilizamos nifedipino (3 μ M, fig. 22A), KB-R7943 (3 μ M, fig 22B), queleritrina (3 μ M, fig. 22C) y dantroleno (10 μ M, fig 22D), un bloqueante de los canales de rianodina del RE. Sólo este último fármaco produjo diferencias en el perfil de potenciación de ouabaína; sin embargo ésto puede ser atribuible al efecto inhibitor del dantroleno sobre el CICR, que está implicado directamente en la exocitosis inducida por histamina. Si bien el nifedipino no anuló el efecto potenciador de ouabaína, es de notar un cierto enlentecimiento de esta recuperación que ya no es evidente en los primeros 5 min de incubación con ouabaína.

4.3.- Efecto de ouabaína sobre las respuestas secretoras inducidas por pulsos de calcio

Múltiples trabajos evidencian una fuerte dependencia de las concentraciones intra y extracelulares de Na^+ y Ca^{2+} en los efectos sobre la liberación de catecolaminas inducidos por ouabaína (Torok y Powis, 1990). Para estudiar el proceso de potenciación independientemente de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_e$, diseñamos un protocolo de estimulación basado en la reintroducción de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ en células mantenidas en solución con 0 mM Ca^{2+} (nominal).

4.3.1.- Caracterización de la respuesta a pulsos de calcio

La reintroducción de calcio (en ausencia de despolarización con K^+), en forma de pulsos breves de 10 s cada 3 min, provocó una pequeña respuesta secretora en poblaciones de CCB (Fig. 23A) que se correlacionó con leves incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ medidos con Fluo-4 en células individuales (Fig.23B)

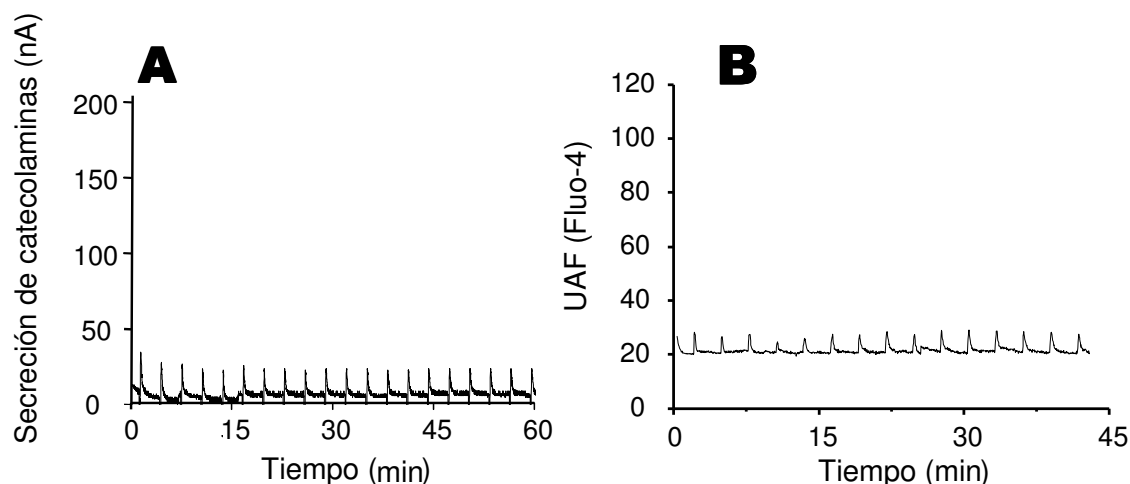


Fig 23.- Caracterización de la respuesta secretora a pulsos de Ca^{2+} (A) Ejemplo representativo de los efectos de la reintroducción de calcio (2 mM, 10 s cada 3 min) en la secreción de catecolaminas medida mediante amperometría en tiempo real. Las células se mantuvieron en solución de 0 Ca^{2+} nominal durante diez minutos previos al experimento. (B) Registro de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ medido en célula aislada con la sonda Fluo-4 en protocolos de estimulación con pulsos de Ca^{2+} 10s/3min. El ejemplo es representativo de un total de 12 células.

Para profundizar en el mecanismo de la secreción inducido por pulsos de calcio, realizamos medidas del potencial de membrana y de $[Ca^{2+}]_c$. La reintroducción de Ca^{2+} produjo una pequeña despolarización de la membrana (6.9 ± 1.0 mV, $n=15$), insuficiente para provocar el disparo de potenciales de acción y la apertura de canales de calcio voltaje-dependientes (Fig. 24).

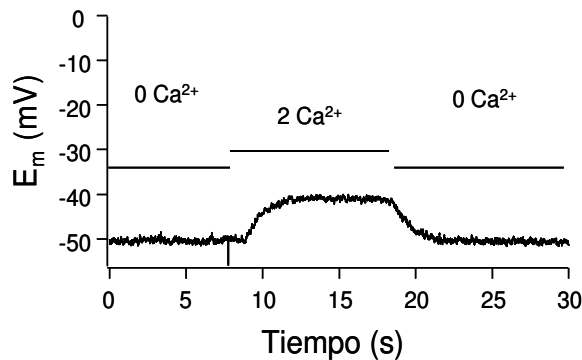


Fig 24.- Registro de potencial de membrana mediante la técnica de patch-clamp en su modalidad de parche perforado y en fijación de corriente. Se muestra el ligero efecto despolarizante del cambio de solución extracelular con 0 Ca^{2+} nominal a una con una concentración de 2 mM Ca^{2+} durante 10 s.

4.3.2.- Potenciación de la respuesta secretora a pulsos de Ca^{2+} inducida por ouabaína

La perfusión de ouabaína (10 μ M) después de tres pulsos control originó un notable incremento en la respuesta a pulsos de calcio que comenzó a los 10 minutos de perfusión y aumentó gradualmente hasta llegar al máximo en unos 30 minutos ($783.2 \pm 94.4\%$; $n=15$) (Fig. 25A). Las respuestas de $[Ca^{2+}]_c$ medidas con Fluo-4 también se vieron enormemente aumentadas en presencia de ouabaína (Fig. 25B)

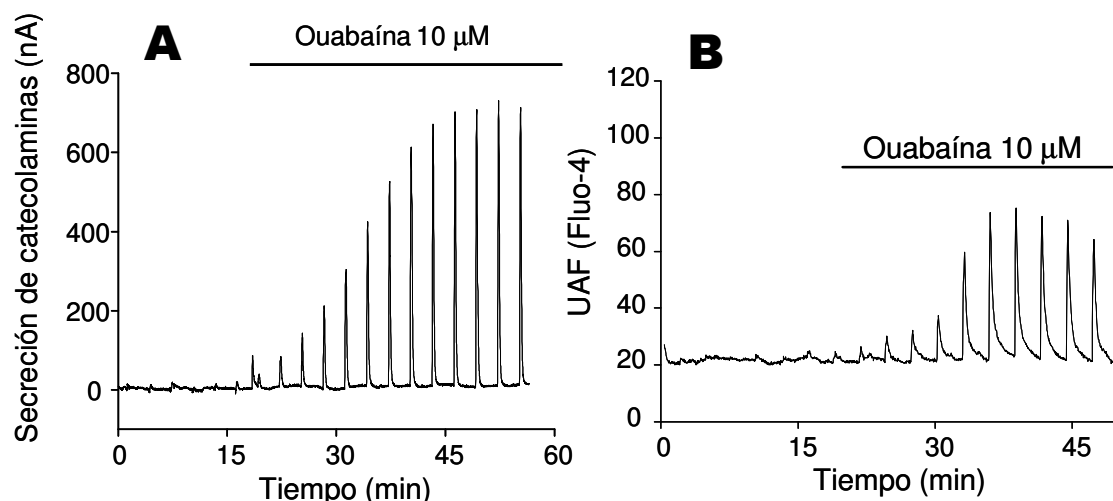


Fig 25.- (A) Ejemplo de potenciación de las respuestas secretoras por 10 μ M de ouabaína sobre la secreción inducida por pulsos de calcio. (B) Registro original de fluorescencia obtenido con la sonda fluo-4 en CCB. En un protocolo de estimulación como el de la Fig. 13B, la aplicación de ouabaína 10 μ M, tras 3-4 pulsos control, aumentó marcadamente la señal fluorescente a pulsos de Ca^{2+} en 15 células estudiadas.

4.3.3.- Participación de los canales L, N y P/Q sobre la potenciación por ouabaína de la secreción inducida por pulsos de Ca^{2+} .

Quisimos evaluar la posible participación de los distintos subtipos de CCVD (L y no-L) en el fenómeno de potenciación por la ouabaína de las respuestas secretoras a pulsos de Ca^{2+} . Por un lado, la introducción de nifedipino ($3 \mu\text{M}$), un bloqueante de los canales L, 45 minutos después de la de ouabaína revirtió completamente la potenciación devolviendo la secreción a sus valores basales. Asimismo, la presencia de nifedipino antes de la adición de ouabaína elimina la aparición del efecto (datos no mostrados).

La incubación de las células durante 15 minutos previos al experimento con toxinas irreversibles bloqueantes de canales N y P/Q (ω -conotoxina-GVIA (GVIA) y agatoxina-IVA), a una concentración de $1 \mu\text{M}$, no modificó el patrón de potenciación sobre pulsos de Ca^{2+} al adicionar $10 \mu\text{M}$ de ouabaína en experimentos como el de la figura 26A. En estos experimentos, el nifedipino ($3 \mu\text{M}$) también eliminó la respuesta potenciada.

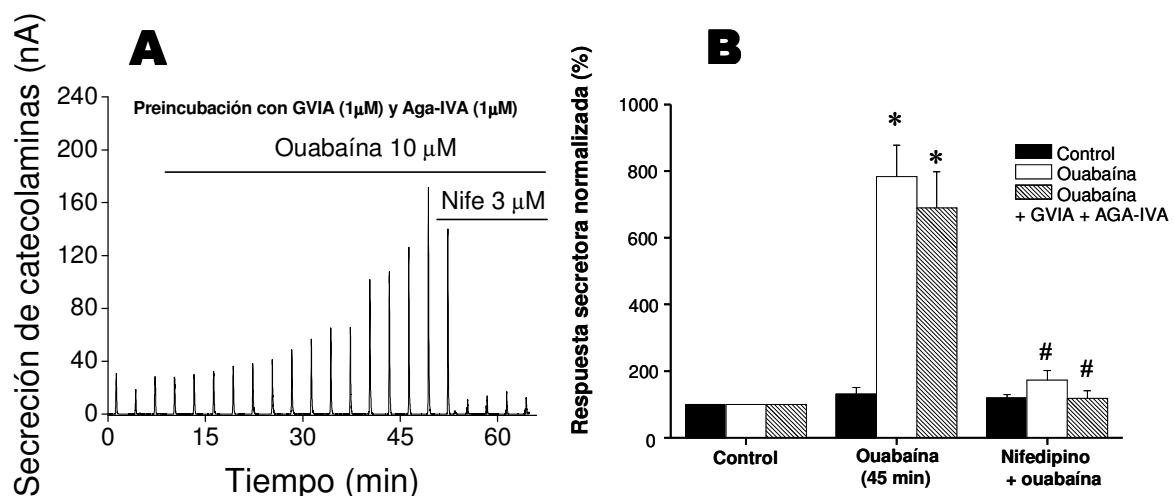


Fig 26.- Efecto de los bloqueantes de CCVD L y no-L sobre la potenciación de las respuestas secretoras a pulsos de Ca^{2+} inducida por ouabaína. (A) La preincubación con $1 \mu\text{M}$ de ω -conotoxina-GVIA (GVIA) y agatoxina-IVA (Aga-IVA) no produjo efecto en el perfil de potenciación; sin embargo la introducción de $3 \mu\text{M}$ nifedipino al final del protocolo revirtió totalmente el efecto de la ouabaína. (B) Representación gráfica de los valores estadísticos normalizados (media \pm e.e.) de potenciación por ouabaína de las respuestas a pulsos de 2 mM Ca^{2+} y su bloqueo por $3 \mu\text{M}$ de nifedipino. El análisis estadístico se realizó mediante la "t" de Student y se representa la significación ($p < 0.05$) del tratamiento con ouabaína respecto a control con asteriscos (*) y con nifedipino respecto a ouabaína con (#).

En la Fig. 26B, se grafican datos normalizados de secreción como media \pm e.e. comparando el efecto de ouabaína sola a los 45 min de perfusión ($783'2 \pm 94'4\%$; $n=12$) y previa incubación con toxinas ($689'95 \pm 108'34\%$; $n=9$). El nifedipino ($3 \mu\text{M}$) revirtió la respuesta secretora a valores de $173'4 \pm 29'0\%$ ($n=12$) con ouabaína sola y $118'33 \pm 23'2\%$ ($n=5$) con ouabaína y toxinas.

Prácticamente toda la respuesta potenciada es bloqueada por nifedipino, lo que sugiere una participación específica del canal de Ca^{2+} tipo L en la potenciación de la respuesta secretora a pulsos de Ca^{2+} en presencia de ouabaína. También se deduce de estos experimentos que ninguno de los CCVD está implicado en la respuesta secretora basal. Utilizando este protocolo experimental, podemos suponer que el acúmulo de Na^+ inducido por ouabaína (que en estas condiciones no puede intercambiarse por Ca^{2+} a través del NCX) despolariza la membrana hasta el umbral de apertura de CCVD. Los canales N y P/Q se inactivan rápidamente por voltaje; no así el L que permanece abierto en condiciones despolarizantes (Villarroya y col., 1999).

4.3.4.- Efecto del vaciado farmacológico del RE sobre la potenciación por ouabaína de la secreción inducida por pulsos de Ca^{2+} .

Para saber si el Ca^{2+} del RE estaba de alguna manera implicado en la potenciación ouabaínica en un modelo de pulsos de Ca^{2+} , de forma análoga a lo observado con pulsos despolarizantes de K^+ , repetimos el protocolo de secreción por reintroducción de calcio en poblaciones de células incubadas con una solución de vaciado del retículo endoplásmico. La solución, preparada a partir de solución Krebs-Hepes, contenía:

- $1 \mu\text{M}$ de tapsigargina, bloqueante de la SERCA
- 20 mM de cafeína, agonista del RyR
- $10 \mu\text{M}$ de rianodina, que bloquea el RyR en su estado abierto

Las células se perfundieron con esta solución 10 minutos antes de comenzar el registro y se mantuvieron en ella todo el experimento. La Fig. 27 muestra un ejemplo de un total de 6 experimentos en los que la mezcla de vaciado no afectó la potenciación inducida por ouabaína.

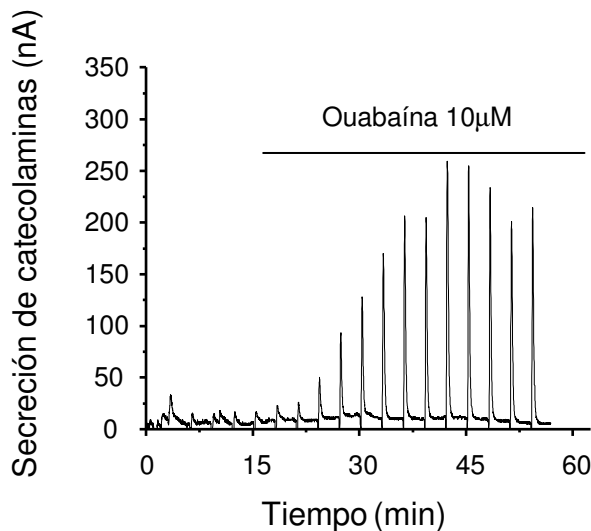


Fig. 27.- El efecto de ouabaína sobre la secreción inducida por pulsos de Ca^{2+} se mantiene en presencia de mezcla CRT de vaciado del RE. Se muestra un ejemplo representativo de un total de 6 experimentos.

4.4.- Efecto de ouabaína sobre la exocitosis estimulada con pulsos de ACh

La acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor fisiológico que promueve la exocitosis en la célula cromafín. En los siguientes experimentos se indujo la exocitosis de catecolaminas con distintas concentraciones de este agonista utilizando la técnica de medida amperométrica de la secreción de catecolaminas como en apartados anteriores. Se modificó la duración de los pulsos a 5 s debido a que el nAChR se desensibiliza rápidamente. Esta desensibilización genera una caída de la respuesta exocitótica; el protocolo de 5s/3min nos permite estimular durante largos periodos minimizando este efecto.

El registro en la figura 28A muestra el efecto de la estimulación secuencial con distintas concentraciones de ACh (100, 10 y 1 μM). La concentración de 1 μM no produjo una respuesta secretora apreciable. Tras 3 ó 4 estímulos con cada concentración, se introdujo ouabaína 10 μM . Las respuestas a ACh 10 y 100 μM se vieron potenciadas con un perfil similar al encontrado con pulsos de K^+ . En

experimentos con una sola dosis de ACh, como el de la Fig 28B, la potenciación de la secreción inducida por ouabaína 10 μ M sobre pulsos de ACh alcanzó un valor de $450 \pm 126\%$ con 10 μ M ACh ($n=5$) y de $210 \pm 32\%$ con 100 μ M ACh ($n=5$) (Figura 28C).

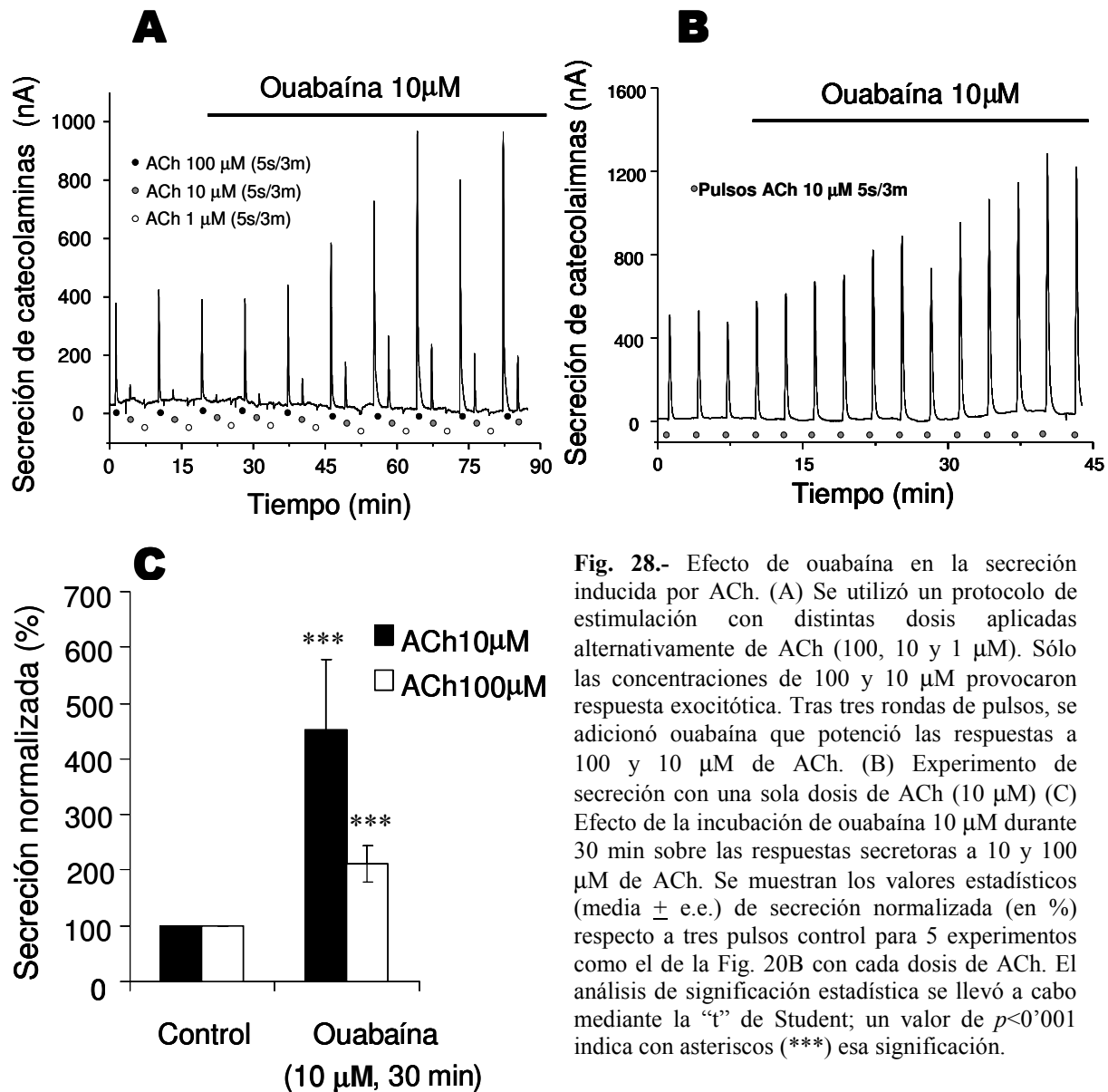


Fig. 28.- Efecto de ouabaína en la secreción inducida por ACh. (A) Se utilizó un protocolo de estimulación con distintas dosis aplicadas alternativamente de ACh (100, 10 y 1 μ M). Sólo las concentraciones de 100 y 10 μ M provocaron respuesta exocitótica. Tras tres rondas de pulsos, se adicionó ouabaína que potenció las respuestas a 100 y 10 μ M de ACh. (B) Experimento de secreción con una sola dosis de ACh (10 μ M) (C) Efecto de la incubación de ouabaína 10 μ M durante 30 min sobre las respuestas secretoras a 10 y 100 μ M de ACh. Se muestran los valores estadísticos (media \pm e.e.) de secreción normalizada (en %) respecto a tres pulsos control para 5 experimentos como el de la Fig. 20B con cada dosis de ACh. El análisis de significación estadística se llevó a cabo mediante la "t" de Student; un valor de $p < 0.001$ indica con asteriscos (***) esa significación.

4.5.- Liberación de Ca^{2+} reticular por aplicación de histamina y ouabaína en CCB transfectadas con camaleón-D1

Partiendo del efecto inhibitor de la potenciación de la secreción por tapsigargina, 2-APB y cafeína, que indica el notable efecto sobre la secreción por salida de Ca^{2+} reticular inducidos por ouabaína, así como de las evidencias de otros autores que relacionan al retículo endoplásmico con la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, quisimos evaluar el efecto de ouabaína sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$.

Para ello, transfectamos CCB con un plásmido que codifica para una proteína sensible a Ca^{2+} dirigida al RE, el camaleón-D1 (Palmer y col., 2004). Los siguientes experimentos se han llevado a cabo en células con 3-4 días en cultivo tras la transfección. En ellos, sometimos a las células a pulsos de histamina 100 μM (de 1 min de duración) y de ouabaína 10 y 100 μM (de 5 min de duración).

La Fig. 29A muestra como líneas negras el efecto de estas sustancias sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ medida como razón de fluorescencia 512/480 normalizada. Como era de esperar, la histamina provocó notables caídas en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ en un 75'9% de las 83 células estudiadas (Núñez y col., 1995). La ouabaína también generó caída de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ de forma dosis-dependiente en un porcentaje (44'5%) de las células estudiadas. Quisimos comprobar si la disminución de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ en presencia de ouabaína podía estar relacionada con el receptor de IP_3 . Tras una primera aplicación de His 100 μM , OUB 10 ó 100 μM , perfundimos 2-APB a una concentración de 10 μM durante 10 min y repetimos el estímulo en 4 células de cada grupo. La respuesta se representa como líneas grises en la Fig. 29A. El 2-APB eliminó la caída en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ generada por ouabaína e inhibió notablemente la respuesta a His 100 μM .

En la Fig. 29B se muestran los valores estadísticos de razón de fluorescencia 512/480 normalizada para las distintas condiciones de estimulación. Nótese que la aparición de respuestas a histamina y ouabaína no tuvieron relación entre sí; encontramos células que respondieron a uno, los dos o ninguno de los compuestos.

La figura 29C reproduce en una selección de imágenes el efecto de la aplicación de ouabaína (100 μM) sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ (como UAF) en una CCB transfectada con el plasmido camaleón-D1

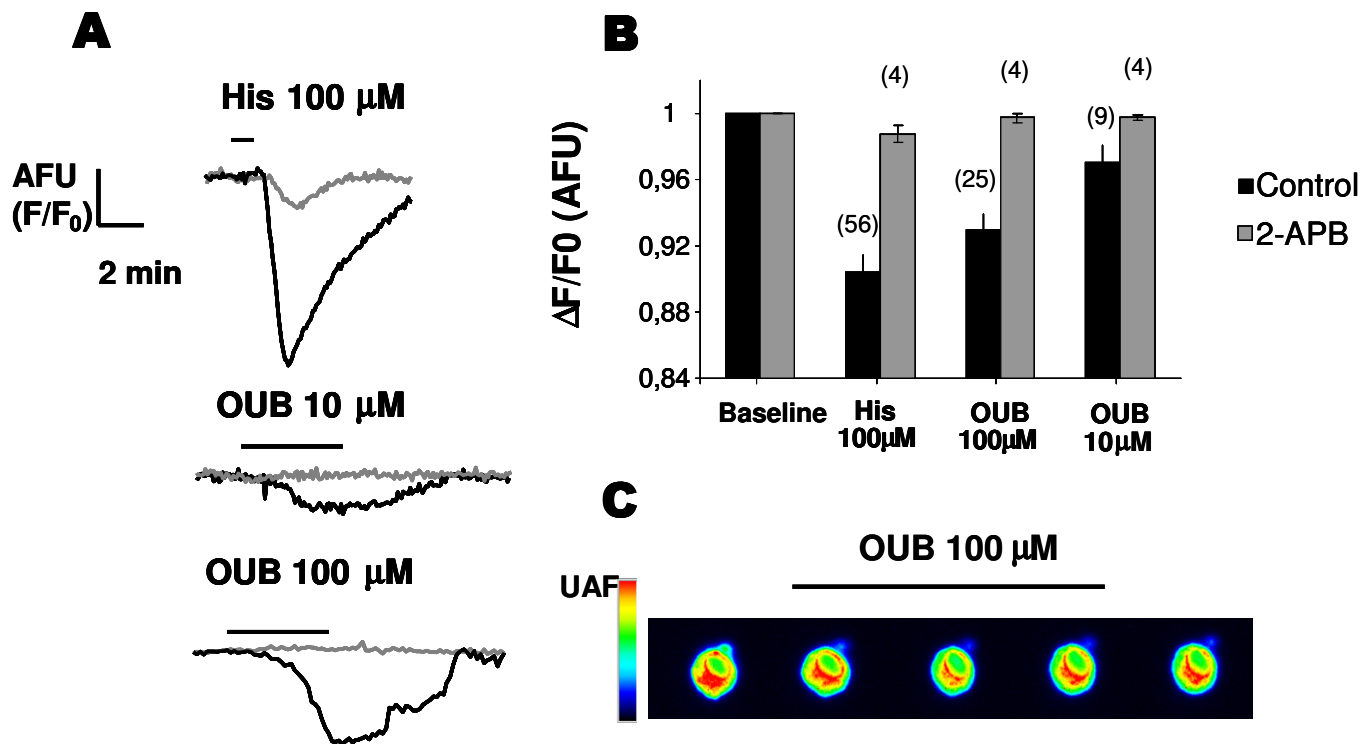


Figura 29: Se transfectaron CCB mediante electroporación con la proteína fluorescente sensora de Ca^{2+} camaleón-D1 dirigida al RE. (A) Ejemplos del cociente de fluorescencia 512/480 normalizado tras estimular con histamina (His) 100 μM y OUB 100 y 10 μM . Estos ejemplos son representativos de un total de 83 células en los que solamente un porcentaje de células mostraron respuesta a ouabaina y/o a histamina. (B) Valores estadísticos de cociente de fluorescencia 512/480 normalizado para el número de datos indicado entre parentesis. (C) Imágenes secuenciales que muestran el efecto de una aplicación de OUB 100 μM sobre el cociente de fluorescencia 512/480 en una CCB transfectada con el plásmido camaleón-D1.

4.6.- Estudio de movilidad vesicular mediante la técnica de TIRFM

En los experimentos de amperometría en célula única previamente presentados, no se detectaron modificaciones en el contenido cuantitativo de catecolaminas de las vesículas exocitóticas ni cambios en los parámetros cinéticos de la liberación cuantitativa de catecolaminas, sino una mayor cantidad de vesículas liberadas con cada pulso de K^+ . Cabe suponer por tanto que el fenómeno de potenciación puede deberse a una mayor disponibilidad de vesículas en el depósito de liberación rápida y/o a una mayor movilidad entre las distintas poblaciones de vesículas.

El ligero incremento en la $[Ca^{2+}]_c$ detectado en CCB en presencia de ouabaína (de la Fuente y col., 1996) puede agilizar los procesos de maduración y transporte de vesículas exocitóticas, aumentando la disponibilidad de vesículas listas para ser liberadas (Neher, 1998). Nuestros experimentos de medida de $[Ca^{2+}]_{RE}$ apuntan a esta organela como una fuente primaria para este incremento de $[Ca^{2+}]_c$. La liberación de Ca^{2+} de las organelas intracelulares se ha propuesto como un factor relevante en el control de la movilidad vesicular en células cromafines (García y col., 2006).

La visualización mediante TIRFM de vesículas exocitóticas marcadas con proteínas fluorescentes nos ha permitido caracterizar *in vivo* parámetros cinéticos de las vesículas en presencia y ausencia de ouabaína. El marcaje de las vesículas se realizó mediante transfección con un derivado de la proteína neuropéptido Y (NPY), que está presente constitutivamente en las vesículas cromafines, unido a la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP, del inglés *Enhanced Green Fluorescent Protein*).

Varios autores han validado el uso de TIRFM para analizar el comportamiento de las vesículas en células cromafines (Steyer y Almers, 1999) y PC12 (Yang y col., 2002). Para este estudio, hemos aplicado el método del desplazamiento medio cuadrado (MSD, *Mean Square Displacement*) descrito por Sharira Nofal y colaboradores (Nofal y col., 2007), que nos permite, analizando la movilidad de vesículas individuales, diferenciar distintos depósitos vesiculares.

La figura 30A muestra un ejemplo de imagen TIRFM de una célula comafin bovina transfectada con NPY-EGFP. El tamaño aparente de las vesículas está relacionado con la proximidad de las mismas a la membrana plasmática; las más brillantes se corresponden con vesículas ancladas a la membrana, listas para sufrir exocitosis. En la Fig. 30B se muestran imágenes secuenciales de dos regiones de la misma célula. En la fila superior, las vesículas están alejadas de la membrana y tienen un alto índice de movilidad, mientras que las vesículas más grandes se encuentran en posiciones fijas, más cercanas al plasmalema.

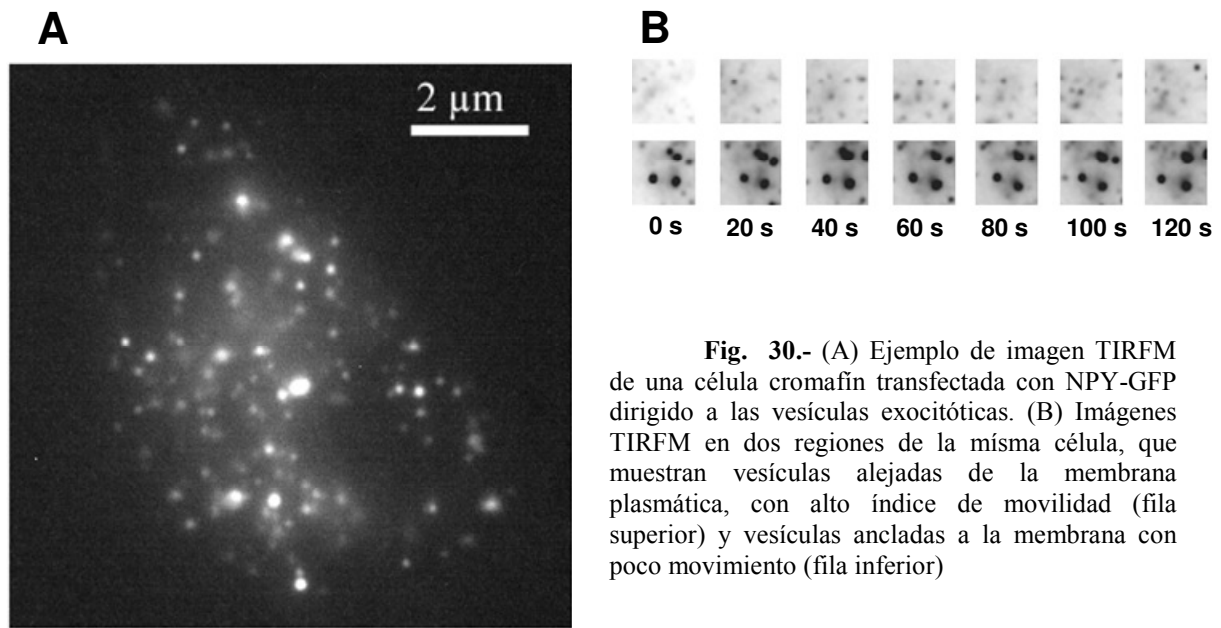


Fig. 30.- (A) Ejemplo de imagen TIRFM de una célula cromafín transfectada con NPY-GFP dirigido a las vesículas exocitóticas. (B) Imágenes TIRFM en dos regiones de la misma célula, que muestran vesículas alejadas de la membrana plasmática, con alto índice de movilidad (fila superior) y vesículas ancladas a la membrana con poco movimiento (fila inferior)

Si bien sería deseable establecer comparaciones en la misma célula antes y después de la incubación con ouabaína, el método utilizado no es aplicable si el comportamiento de las vesículas cambia a lo largo del tiempo. Por tanto, dividimos la población de estudio en un grupo control y un grupo de estudio que se incubó con 10 μ M de ouabaína durante una hora antes de comenzar el registro.

El valor de MSD medio de las vesículas de CCB transfectadas a temperatura ambiente fue muy bajo ($1'71 \pm 0'10$ píxeles) pero aumentó considerablemente en presencia de ouabaína ($4'37 \pm 0'33$ píxeles) (Fig. 31A). En un segundo grupo de experimentos realizados en CCB a 37 °C se observa en cambio que la ouabaína reduce la movilidad vesicular, pasando de $10'08 \pm 0'56$ píxeles en los controles a $6'43 \pm 0'39$ en presencia de ouabaína (Fig. 31B).

El efecto de ouabaína a distintas temperaturas es aparentemente paradójico; pero hay que considerar que la movilidad vesicular es fuertemente dependiente de la temperatura (Dinkelacker y col., 2000); nótese el notable incremento de movilidad vesicular a las dos temperaturas estudiadas en CCB sin tratar. A temperatura ambiente, la tasa de rellenado de los depósitos vesiculares está disminuida; en estas condiciones, la ouabaína aceleraría el proceso y su efecto se manifiesta fundamentalmente en depósitos más inmaduros de la célula. A 37 °C el transporte y reciclado de vesículas en

depósitos inmaduros funcionan a pleno rendimiento (Gil y col., 2001) y la acción de ouabaína se hace evidente sólo sobre las últimas etapas de maduración de las vesículas.

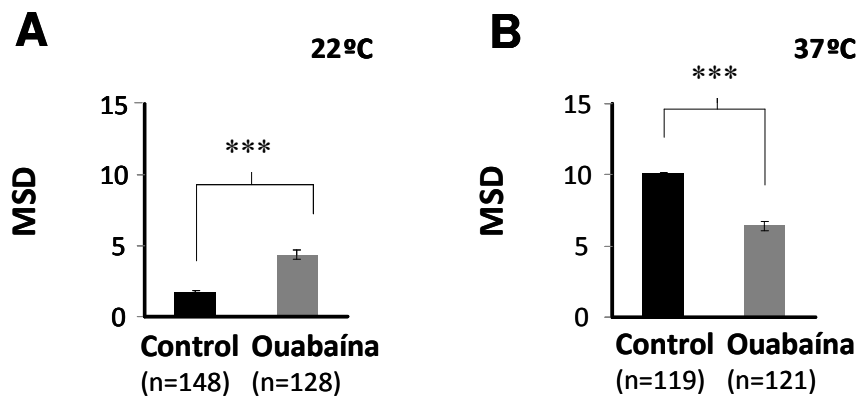


Fig 31.- Efecto de ouabaína sobre la movilidad media de las vesículas en CCB transfectadas con NPY-EGFP. (A) A 22°C, la movilidad vesicular en las 18 células control estudiadas es muy baja y se triplicó tras incubación durante 1 h con ouabaína 10 μ M (17 células) (B) La movilidad de las vesículas de las 31 células control estudiadas a 37°C es elevada y disminuye en las 23 células tratadas con ouabaína 10 μ M. Se muestran los valores medios (media \pm e.e.) de células procedentes de tres cultivos diferentes. El número de vesículas analizadas para cada grupo se muestra entre paréntesis. El análisis estadístico se realizó mediante un test “t” de Student (***) $p<0.001$.

4.7.- Internalización de ouabaína-Bodipy-FL

La ouabaína se ha considerado tradicionalmente un fármaco que actúa a nivel de membrana plasmática. Si bien es una molécula de naturaleza esteroidea, su estructura comprende varios grupos polares que le confieren una marcada hidrosolubilidad y hacen que no pueda atravesar por sí misma la membrana plasmática y actuar sobre dianas intracelulares. El único receptor/diana conocido para esta molécula es la bomba de sodio del plasmalema, si bien recientes estudios han descrito lugares de unión intracelulares para glucósidos cardiotónicos, que podrían actuar como receptores potenciales para ouabaína. En concreto, en la membrana del retículo sarcoplásmico de cardiomiocitos de rata, se ha descrito la presencia de una proteína afín a glucósidos cardiotónicos (Fujino y Fujino, 1995) y la capacidad de ouabaína de modular la actividad de los RyR (Sagawa y col., 2001).

Por otro lado, se ha descrito un fenómeno de internalización de la bomba Na^+/K^+ ATP-asa promovido por ouabaína que requiere de un mecanismo endocitótico (Lin y col., 2005). Hasta la fecha, no se ha comprobado si esta endocitosis de la NKA también supone la internalización de ouabaína.

En los siguientes experimentos, quisimos visualizar el patrón de unión de ouabaína a la Na^+/K^+ ATP-asa de la membrana plasmática y evaluar la posible actividad de ouabaína en dianas intracelulares. El conjugado fluorescente ouabaína-Bodipy-FL (OUB-FL) fue añadido, a concentraciones de 300 nM y 10 μM , a cubreobjetos con CCB para su posterior visualización en un microscopio confocal. El uso de estas dos dosis nos puede permitir diferenciar la presencia de distintas isoformas de la subunidad α de la NKA en la membrana plasmática de nuestros cultivos, que podrían tener distinta afinidad por el digitálico.

La Fig 32A muestra una serie de imágenes confocales obtenidas a distintos tiempos tras añadir OUB-FL a una concentración de 10 μM . La primera imagen (tiempo 0) se tomó nada más añadir el fármaco fluorescente. Éste se adhirió a zonas específicas de la membrana plasmática pero no se detectó en el interior de las células. En las imágenes sucesivas, tomadas a los 15, 30 y 45 minutos de adición de la sonda, se observa cómo la fluorescencia en membrana va perdiendo la localización selectiva para adoptar una distribución homogénea a la par que encontramos señal fluorescente en el interior del citoplasma, sobre todo en zonas alejadas del plasmalema. A la concentración de 300 nM también se observó un marcaje punteado en la membrana plasmática que fue difuminándose conforme la sonda fluorescente fue accediendo al interior celular.

La Fig. 32B muestra imágenes confocales secuenciales de una CCB incubada durante 2 h con 300 nM de OUB-FL a las que se sustrajo la fluorescencia de la primera imagen de la serie (tiempo 0), eliminando la señal extracelular y de membrana. A lo largo del tiempo, la fluorescencia en el interior de la célula aumenta progresivamente en presencia del fármaco fluorescente. Este fenómeno se observó tanto con la concentración de 300 nM como con la de 10 μM en un total de 18 células para cada concentración procedentes de 3 cultivos diferentes. No se observó entrada de ouabaína al núcleo durante las dos horas de duración del experimento.

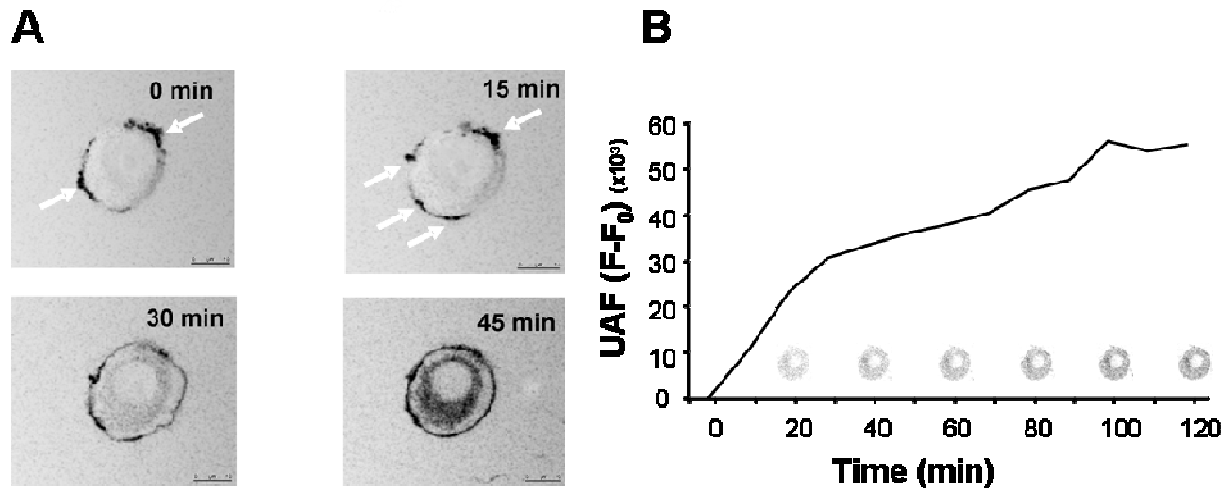


Fig 32.- (A) Imágenes confocales secuenciales obtenidas por combinación de imagen transmitida y del canal de fluorescencia emitida a 488 nM, que representan la localización de OUB-FL (10 μ M) en el momento de la adición al medio de cultivo (0 min) y en los 15, 30 y 45 min posteriores. A 0 y 15 minutos se observa un marcaje fluorescente en zonas concretas de la membrana plasmática (flechas blancas). A los 30 y 45 minutos, se pierde la localización selectiva en el plasmalema a la par que la sonda va introduciéndose en el citoplasma. (B) Curso temporal que muestra, como unidades arbitrarias de fluorescencia, el incremento progresivo de la fluorescencia intracelular en una serie de imágenes confocales secuenciales tomadas cada 20 min durante 2 h a las que se sustrajo la fluorescencia inicial (a tiempo 0) tras añadir 300 nM de OUB-FL.

V. DISCUSIÓN

¿Qué es la felicidad? La sensación de que el poder crece y la resistencia se ha superado
Friedrich Nietzsche

Los glucósidos cardiotónicos, además de poseer notables acciones sobre el sistema cardiovascular, promueven la liberación de neurotransmisores en distintos tejidos y cultivos celulares. El efecto neuroestimulante de la ouabaína y otros fármacos de la familia de esteroides cardiotónicos está claramente asociado con la inhibición del transporte Na^+/K^+ y, por tanto, de la alteración de los gradientes iónicos a ambos lados de la membrana celular. Nuestro trabajo pretende analizar este fenómeno utilizando los conocimientos y técnicas actuales sobre la exocitosis, centrándonos en la importancia del ion Ca^{2+} .

El Ca^{2+} es un mediador ubicuo para multitud de funciones celulares. En concreto la exocitosis de neurotransmisores es dependiente de cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en todos sus pasos. La participación de las organelas intracelulares en el control de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ está cobrando importancia en los últimos años como un factor relevante en el control de la exocitosis. En concreto, la participación del Ca^{2+} del RE en las respuestas secretoras a K^+ ya ha sido verificado (Lara y col., 1997) y también se sabe que participa, mediante activación de cinasas intracelulares, en el transporte y maduración de las vesículas exocitóticas (Levitan, 2008).

La concentración de 10 μM de ouabaína que hemos utilizado en este estudio está muy alejada de las concentraciones en plasma, donde aparece en concentraciones pico o nanomolares. Las células de la zona fasciculata de la corteza suprarrenal liberan ouabaína frente a distintos estímulos (angiotensina II, ACh, dopamina) e incluso se ha descrito la presencia de este esteroide en cultivos de células cromafines. Se ha estimado que la concentración basal de ouabaína en la glándula adrenal está en el rango de cientos de nanomolar y ésta puede elevarse unas 500 veces en situación de ejercicio físico, llegando a concentraciones micromolares. En trabajos previos de nuestro laboratorio, la concentración de 10 μM de ouabaína produjo un efecto máximo que podía ser fácilmente medido en protocolos de duración moderada (una hora de estimulación) (de Pascual y García, 2007), si bien 1 μM también provocó efectos potenciadores de la secreción (datos no mostrados). Por estas razones, unido a su facilidad de obtención y manejo y a la amplia base bibliográfica sobre los mecanismos que regulan la exocitosis en este modelo de paraneurona, hemos considerado la célula cromafín como un modelo válido para el estudio que nos planteamos.

Primeramente, hemos establecido un modelo de estudio de secreción con distintos secretagogos. Utilizando la detección amperométrica en tiempo real, hemos confirmado que la ouabaína, a una concentración de 10 μM , aumenta la liberación de catecolaminas en poblaciones de CCB estimuladas con pulsos intermitentes de K^+ , ACh y reintroducción de Ca^{2+} y que también es capaz de revertir rápidamente la desensibilización de la respuesta secretora con agentes que movilizan Ca^{2+} del depósito del RE (cafeína e histamina).

El incremento en la liberación de catecolaminas ante estímulos de 35K^+ aparece tras unos 15 minutos de incubación con el fármaco. Esto es compatible con el mecanismo de acción propuesto para los glucósidos cardiotónicos, según el cual la inhibición de la NKA genera una acumulación gradual de Na^+ en el citosol. El aumento en la $[\text{Na}^+]_c$ activa el modo reverso del NCX, que introduce Ca^{2+} en la célula. Hasta la fecha, este Ca^{2+} que proviene del exterior de la célula ha sido la única explicación para el fenómeno de la potenciación de la secreción por ouabaína y sustancias análogas. Hemos confirmado que la adición de KB-R7943 a una concentración de 3 μM elimina el efecto potenciador de ouabaína sobre la secreción inducida por K^+ , verificándose la participación del NCX.

En los últimos años se ha observado que la ouabaína es capaz, en células del túbulo proximal del riñón de distintas especies, de aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ de forma dependiente del Ca^{2+} del RE. Se ha propuesto que el extremo N-terminal de la NKA puede acoplarse al extremo carboxilo de IP_3R del RE y facilitaría o provocaría su apertura (Aizmann y col., 2001; Miyakawa-Naito y col., 2003; Yuan y col., 2005). La participación del Ca^{2+} procedente de organelas intracelulares se ha propuesto también como mecanismo implicado en la potenciación inducida por ouabaína en células cromafines (García y col., 1981). Efectivamente, la adición de fármacos que bloquean las principales estructuras de entrada y salida de Ca^{2+} en el RE eliminan el efecto de ouabaína en nuestro modelo de secreción en poblaciones. Nuestros experimentos demuestran que, si bien es necesaria la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través del NCX, también es necesario que este Ca^{2+} sea captado y liberado por el RE para provocar efectos en la liberación de catecolaminas. Es de notar a este respecto que la activación del modo reverso del NCX genera una salida de Ca^{2+} del RE en neuronas

de rata (Wu y col., 2008), fenómeno que parece acoplado a una captación simultánea de Ca^{2+} por el RE a través de la SERCA (Hirota y col., 2006).

Con estos datos, podemos sugerir una nueva diana para explicar el mecanismo de acción de los esteroides cardiotónicos que implica al RE. De acuerdo con estudios de inmunotinción realizados en células cromafines, la isoforma α_2 de la NKA colocaliza con el NCX del plasmalema y ciertas zonas del RE ricas en IP_3R . El acúmulo de Na^+ tras la inhibición de la NKA por esteroides cardiotónicos y la reversión del NCX se producirían entonces en zonas definidas del subplasmalema. Esto permite explicar algunos datos incongruentes de la literatura, como lo es el hecho de que la inhibición del transporte de Na^+ en presencia de ouabaína no se correlacione con un incremento medible en la $[\text{Na}^+]_c$ (Arnon y col., 2000). La $[\text{Ca}^{2+}]_c$ sí aumenta ligeramente (hasta unos 200 nM) a los 15-20 minutos de incubación con ouabaína en células cromafines bovinas (de la Fuente y col., 2006). Esta $[\text{Ca}^{2+}]_c$ está precisamente en el rango de mayor probabilidad de apertura de los canales de salida de Ca^{2+} del RE (IP_3R y RyR) (Bezprozvanny y col., 1991). Efectivamente, la ouabaína, a la concentración que potencia la exocitosis en nuestros experimentos de secreción (10 μM), genera una modesta salida de Ca^{2+} del RE que es inhibida por 10 μM de 2-APB. La respuesta no se desensibilizó durante los 5 minutos de aplicación del compuesto. Este “goteo” de Ca^{2+} es autolimitado (los canales se cierran a una $[\text{Ca}^{2+}]_c$ por encima de 300 nM) y, si bien no puede generar respuesta exocitótica *per se*, sí podría afectar a multitud de procesos celulares como el transporte y maduración vesiculares.

También hemos estudiado el efecto del bloqueo selectivo de los distintos subtipos de CCDV en protocolos de estimulación con 35K^+ . Ni el nifedipino ni las toxinas consiguieron eliminar el efecto potenciador de ouabaína (Fig. 14). De cualquier forma, se observa que la efectividad relativa de la ouabaína aumenta cuando sólo el canal L está funcional (bloqueo con Aga-IVA y $\omega\text{-GVIA}$), mientras que disminuye al bloquear los canales L con nifedipino. No disponemos de una explicación completa para este hecho, si bien varias referencias apuntan a una estrecha relación de los canales L con el Ca^{2+} del RE en otros modelos experimentales, que podría estar afectado en presencia de nifedipino (Pickering y col., 2009; Huang y col., 2007; Sagawa y col., 2001).

Basándonos en los experimentos de amperometría en célula única (Figs. 11 y 12), deducimos que existe un mayor número de vesículas exocitóticas listas para ser liberadas en presencia de ouabaína, mientras que los ni parámetros cinéticos ni la carga de estas vesículas se modifican. De aquí surge la hipótesis de que la ouabaína puede fomentar el rellenado de la subpoblación de vesículas listas para sufrir exocitosis, lo que es compatible con el incremento en la $[Ca^{2+}]_c$.

Midiendo la movilidad media de las vesículas con la técnica de TIRFM hemos encontrado grandes diferencias entre trabajar a 22 y a 37°C. A temperatura ambiente, la movilidad vesicular es muy baja, los depósitos fácilmente liberables se rellenan con lentitud y la exocitosis se deprime a largo plazo (Dinkelacker y col., 2000). En estas condiciones, la ouabaína aumenta unas cuatro veces la movilidad media de las vesículas. Considerando que las vesículas atracadas en membrana tienen una movilidad baja en cualquiera de las condiciones estudiadas, este incremento en la movilidad media de las vesículas indica una movilización de los depósitos de reserva en presencia del esteroide ouabaína.

Si trabajamos a temperatura fisiológica (37°C), la movilidad media de las vesículas en CCB es unas 8 veces mayor que a 25°C (Fig. 31). Los sistemas de maduración y transporte vesiculares a esta temperatura funcionan a pleno rendimiento. La adición de ouabaína disminuye la movilidad media vesicular 37°C ya que posiblemente esté favoreciendo el reclutamiento de vesículas en depósitos de reserva hacia los depósitos subplasmalemales, lo que explica el efecto potenciador de la secreción.

Para una mejor comprensión de las acciones de ouabaína sobre la secreción, hemos utilizado otros protocolos de estimulación que no dependen exclusivamente de la apertura de CCDV. Así, si en lugar de alto K^+ estimulamos las células con ACh, el neurotransmisor fisiológico en la sinapsis esplácnico-cromafín, el efecto de ouabaína es aún más notorio. La secreción basal con 10 μ M de ACh llega a cuadruplicarse (Fig. 28). La participación fisiológica de la ouabaína en la génesis de ciertas formas de hipertensión ya ha sido confirmada por varios estudios clínicos. Nuestros datos apuntan a un efecto muy significativo sobre la liberación de catecolaminas y por tanto sobre la respuesta al estrés y la tensión arterial.

La respuesta secretora en CCB a altas concentraciones de cafeína e histamina se agota paulatinamente con la estimulación repetida. La ouabaína devuelve la secreción por histamina y cafeína a sus valores originales de forma rápida (Fig. 21). En el caso de la estimulación con histamina, la inhibición del modo reverso del NCX con KB-R7943 no inhibió la recuperación de la respuesta, que por tanto debe seguir un mecanismo distinto al propuesto para la estimulación con 35K^+ . La coaplicación de queleritrina con ouabaína tuvo un tímido efecto enlentecedor respecto a los controles, insuficiente para justificar una acción directa de ouabaína sobre la PKC. Sin embargo, se hace aparente que la recuperación de la respuesta puede implicar también fenómenos de transporte de vesículas. El nifedipino enlenteció la recuperación de la respuesta secretora por ouabaína frente a estimulación con histamina. Una vez más, el canal de calcio tipo L participa, aunque de forma parcial, en la potenciación ouabaínica de la secreción, aunque no es una condición necesaria para la misma. El dantroleno sí produjo una marcada disminución en la eficiencia de ouabaína al regenerar las respuestas secretoras a histamina, indicando que el RyR tiene un papel parcial en este fenómeno.

La reintroducción de Ca^{2+} ya ha sido utilizada para estudiar la potenciación de la secreción por ouabaína (Esquerro y col., 1980). En este modelo de exocitosis, la señal secretora al perfundir una solución con 2 mM Ca^{2+} se puede explicar por la acción de la entrada capacitativa y por reversión del NCX. Entre pulsos, la ausencia de Ca^{2+} extracelular condiciona unos niveles bajos de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ en las células y hace improbable que la ouabaína pueda elevarlos, ni siquiera a partir de los reservorios de Ca^{2+} intracelular, que se vacían en cuestión de segundos en 0 mM Ca^{2+} (nominal).

Con los protocolos utilizados la ouabaína aumenta notablemente la exocitosis (Fig. 25A) y sin participación aparente del RE (Fig. 27). En este caso, la adición del bloqueante de los CCDV del subtipo L nifedipino (3 μM) revirtió toda la secreción potenciada por ouabaína, mientras que el bloqueo de los otros canales de Ca^{2+} (N y P/Q) no tuvo efecto alguno (Fig. 26). Para explicar este efecto, debemos considerar que el NCX no puede funcionar en modo reverso en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Sugerimos que, por tanto, al inhibir el transporte de Na^+ , el aumento de la $[\text{Na}^+]_e$ no puede ser compensado y la membrana se despolariza alcanzando el umbral de apertura de los CCDV. Los canales N y P/Q son rápidamente inactivables por voltaje, no así el L, que permanecería abierto. La reintroducción de Ca^{2+} en presencia de ouabaína genera una

entrada masiva de este ión al interior celular (Fig. 25B) que es responsable de la notable señal exocitótica que hemos observado.

Otro aspecto del mecanismo de acción de ouabaína que hemos querido estudiar ha sido la unión del compuesto a la membrana plasmática y su posible internalización en el citosol. Se ha descrito la internalización en el citosol de la NKA en presencia de algunos agentes entre ellos la ouabaína. La adición de ouabaína acoplada a una sonda fluorescente nos ha permitido visualizar la localización selectiva de la NKA en ciertas zonas de la membrana. A lo largo del tiempo, el marcaje selectivo se va difuminando por toda la superficie de la membrana al mismo tiempo que se observa la internalización de la sonda en el interior del citosol. Considerando las referencias publicadas al respecto, suponemos que la NKA se internaliza junto con el fármaco mediante un mecanismo endocitótico (Liu y col., 2007). La internalización es lenta y paulatina, de forma parecida al incremento de la exocitosis en presencia de ouabaína. Está generalmente aceptado que la NKA, además de su reconocida función de transporte de iones, funciona también como lo haría un receptor de esteroides de membrana; el significado funcional de la migración del receptor al interior celular están aún por descubrir.

Nuestros datos revelan la capacidad de la ouabaína de movilizar Ca^{2+} de depósitos intracelulares, que, si bien habían sido deducidas por otros autores, no habían sido demostradas con una medida directa hasta la fecha. La importancia del Ca^{2+} reticular en la exocitosis de neurotransmisores se pone de manifiesto por el marcado efecto de ouabaína sobre los depósitos de vesículas. Este Ca^{2+} sería capaz de, por ejemplo, activar la calmodulina cinasa citosólica y mejorar el transporte de vesículas (Shakiryanova y col., 2007).

Paralelo a la salida continuada de Ca^{2+} del RE debe existir una entrada de Ca^{2+} en este depósito, ya que no se observa caída progresiva en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ en presencia de ouabaína (Fig. 29). Considerando que la entrada a través de CCDV no está activada (la ouabaína, a una concentración 10 veces superior a la que potencia la exocitosis, apenas despolariza la membrana unos 10 mV), las dos vías de entrada de Ca^{2+} más probables serían el NCX y la entrada capacitativa por SOCE. Nuestros experimentos no nos permiten descartar la implicación de la SOCE, pero el efecto bloqueante de KB-R7943 sobre la potenciación ouabaínica indica un papel significativo del NCX en modo

reverso. La inhibición del transporte Na^+/K^+ altera los gradientes iónicos de Na^+ en determinadas zonas de la submembrana (los llamados plasmersomas) y permite la activación del NCX en modo reverso, que introduce Ca^{2+} desde el exterior celular que sería captado por la SERCA, regenerando la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$. Este proceso se esquematiza en la Fig. 33:

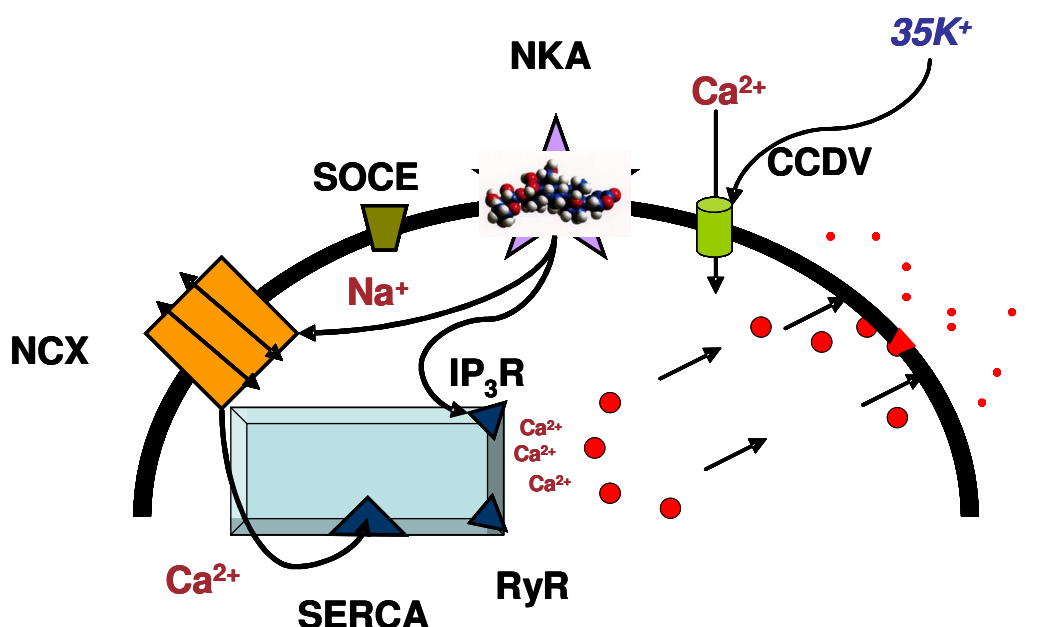


Fig 33.- Modelo de mecanismo de acción que proponemos para explicar el efecto potenciador de la ouabaína sobre la exocitosis inducida por K^+ en CCB. La unión de ouabaína a la bomba Na^+/K^+ -ATPasa (NKA) provoca, a través de un incremento de la $[\text{Na}^+]_i$, la entrada de Ca^{2+} en el citosol a través del NCX. Este Ca^{2+} se captaría por la SERCA para recargar el RE ya que, paralelo a este proceso, se produce salida de Ca^{2+} a través de los IP_3R reticulares. Por otra parte, la NKA unida a ouabaína favorecería la liberación de Ca^{2+} del RE. El Ca^{2+} que se vierte al citosol favorece los procesos de transporte y maduración vesiculares, aumentando el contingente de vesículas atracadas en la membrana plasmática que están disponibles para ser exocitadas tras la apertura de los CCDV por un estímulo despolarizante (35K^+).

VI. Conclusiones

"La ciencia es maravillosa si no tienes que ganarte la vida con ella"

Albert Einstein

6.1.- Conclusiones parciales

1.- La perfusión de ouabaína a una concentración de 10 μM **incrementa la liberación de catecolaminas** en células cromafines bovinas estimuladas con soluciones despolarizantes (35K^+). El aumento es gradual y supone un incremento en el número de vesículas liberadas. Este efecto se observa también con estimulando con ACh.

2.- La extinción de la liberación de catecolaminas por movilización de Ca^{2+} reticular con pulsos repetidos de **cafeína e histamina** revierte a sus valores originales en presencia de ouabaína.

3.- En ausencia de Ca^{2+} extracelular y estimulando la secreción con pulsos de 2 mM Ca^{2+} , la ouabaína genera una señal secretora a través de la **apertura del canal L**, seguramente por una despolarización sostenida de la membrana.

3.- El aumento en la secreción sobre pulsos de K^+ depende de la actividad en modo reverso del **intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$** de la membrana plasmática y del depósito de **Ca^{2+} del retículo endoplásmico**.

4.- La ouabaína provoca **liberación de Ca^{2+} reticular** en CCB en un mecanismo dependiente del IP_3R .

5.- La **movilidad vesicular** a 37°C disminuye en presencia de ouabaína, lo que interpretamos como una mayor proporción de vesículas en los depósitos fácilmente liberables.

6.- **La ouabaína se internaliza** en el citosol de células cromafines bovinas siguiendo un curso temporal similar al del aumento en la secreción de catecolaminas.

6.2.- Conclusión general

En conjunto, estos datos son compatibles con la idea de que existe una conexión entre la NKA de la membrana plasmática y el receptor de IP_3 del RE. Al unirse la ouabaína a la NKA, se activaría esta conexión para favorecer la liberación de Ca^{2+} del RE. Este Ca^{2+} se utilizaría para asegurar la eficacia de la secreción de catecolaminas manteniendo lleno el contingente de vesículas atracadas al plasmalema.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Si no eres parte de la solución, eres parte del precipitado
Henry J. Tillman

- Abete, P., & Vassalle, M. (1988). Relation between $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump, Na^+ activity and force in strophanthidin inotropy in sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol*, 404, 275-299.
- Aizman, O., Uhlen, P., Lal, M., Brismar, H., & Aperia, A. (2001). Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(23), 13420-13424.
- Akera, T., & Brody, T. M. (1977). The role of $\text{Na}^+\text{,K}^+\text{-ATPase}$ in the inotropic action of digitalis. *Pharmacol Rev*, 29(3), 187-220.
- Albillos, A., Neher, E., & Moser, T. (2000). R-Type Ca^{2+} channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *J Neurosci*, 20(22), 8323-8330.
- Aldea, M., Jun, K., Shin, H. S., Andres-Mateos, E., Solis-Garrido, L. M., Montiel, C., et al. (2002). A perforated patch-clamp study of calcium currents and exocytosis in chromaffin cells of wild-type and $\alpha(1A)$ knockout mice. *J Neurochem*, 81(5), 911-921.
- Alonso, M. T., Barrero, M. J., Carnicero, E., Montero, M., Garcia-Sancho, J., & Alvarez, J. (1998). Functional measurements of $[\text{Ca}^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum using a herpes virus to deliver targeted aequorin. *Cell Calcium*, 24(2), 87-96.
- Alonso, M. T., Barrero, M. J., Michelena, P., Carnicero, E., Cuchillo, I., Garcia, A. G., et al. (1999). Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J Cell Biol*, 144(2), 241-254.
- Alonso, M. T., Montero, M., Carnicero, E., Garcia-Sancho, J., & Alvarez, J. (2002). Subcellular Ca^{2+} dynamics measured with targeted aequorin in chromaffin cells. *Ann N Y Acad Sci*, 971, 634-640.
- Altamirano, J., Li, Y., DeSantiago, J., Piacentino, V., 3rd, Houser, S. R., & Bers, D. M. (2006). The inotropic effect of cardioactive glycosides in ventricular myocytes requires $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger function. *J Physiol*, 575(Pt 3), 845-854.
- Allersma, M. W., Wang, L., Axelrod, D., & Holz, R. W. (2004). Visualization of regulated exocytosis with a granule-membrane probe using total internal reflection microscopy. *Mol Biol Cell*, 15(10), 4658-4668.
- Antolovic, R., Bauer, N., Mohadjerani, M., Kost, H., Neu, H., Kirch, U., et al. (2000). Endogenous ouabain and its binding globulin: effects of physical exercise and study on the globulin's tissue distribution. *Hypertens Res*, 23 Suppl, S93-98.
- Aosaki, T., & Kasai, H. (1989). Characterization of two kinds of high-voltage-activated Ca^{2+} -channel currents in chick sensory neurons. Differential sensitivity to dihydropyridines and omega-conotoxin GVIA. *Pflugers Arch*, 414(2), 150-156.
- Aperia, A. (2007). New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med*, 261(1), 44-52.
- Arnaiz-Cot, J. J., de Diego, A. M., Hernandez-Guijo, J. M., Gandia, L., & Garcia, A. G. (2008). A two-step model for acetylcholine control of exocytosis via nicotinic receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 365(3), 413-419.
- Arnon, A., Hamlyn, J. M., & Blaustein, M. P. (2000). Ouabain augments Ca^{2+} transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na^{+} . *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279(2), H679-691.

- Augustine, G. J., & Neher, E. (1992). Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol*, 450, 247-271.
- Aunis, D., & Garcia, A. G. (1981). Correlation between catecholamine secretion from bovine isolated chromaffin cells and [3H]-ouabain binding to plasma membranes. *Br J Pharmacol*, 72(1), 31-40.
- Axelrod, D., Thompson, N. L., & Burghardt, T. P. (1983). Total internal reflection fluorescent microscopy. *J Microsc*, 129(Pt 1), 19-28.
- Baker, P. F., Blaustein, M. P., Keynes, R. D., Manil, J., Shaw, T. I., & Steinhardt, R. A. (1969). The ouabain-sensitive fluxes of sodium and potassium in squid giant axons. *J Physiol*, 200(2), 459-496.
- Baker, P. F., & Crawford, A. C. (1975). A note of the mechanism by which inhibitors of the sodium pump accelerate spontaneous release of transmitter from motor nerve terminals. *J Physiol*, 247(1), 209-226.
- Balnave, R. J., & Gage, P. W. (1974). On facilitation of transmitter release at the toad neuromuscular junction. *J Physiol*, 239(3), 657-675.
- Banks, P. (1967). The effect of ouabain on the secretion of catecholamines and on the intracellular concentration of potassium. *J Physiol*, 193(3), 631-637.
- Bauer, N., Muller-Ehmsen, J., Kramer, U., Hambarchian, N., Zobel, C., Schwinger, R. H., et al. (2005). Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: effects of beta-blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension*, 45(5), 1024-1028.
- Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361(6410), 315-325.
- Bezprozvanny, I., Watras, J., & Ehrlich, B. E. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*, 351(6329), 751-754.
- Birks, R. I., & Cohen, M. W. (1968). The action of sodium pump inhibitors on neuromuscular transmission. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 170(21), 381-399.
- Birks, R. I., & Cohen, M. W. (1968). The influence of internal sodium on the behaviour of motor nerve endings. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 170(21), 401-421.
- Birnbaumer, L., Campbell, K. P., Catterall, W. A., Harpold, M. M., Hofmann, F., Horne, W. A., et al. (1994). The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 13(3), 505-506.
- Bittner, M. A., & Holz, R. W. (1992). A temperature-sensitive step in exocytosis. *J Biol Chem*, 267(23), 16226-16229.
- Blanco, G., Melton, R. J., Sanchez, G., & Mercer, R. W. (1999). Functional characterization of a testes-specific alpha-subunit isoform of the sodium/potassium adenosinetriphosphatase. *Biochemistry*, 38(41), 13661-13669.
- Blanco, G., & Mercer, R. W. (1998). Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol*, 275(5 Pt 2), F633-650.
- Blaustein, M. P. (1993). Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. *Am J Physiol*, 264(6 Pt 1), C1367-1387.

- Blaustein, M. P., Juhaszova, M., Golovina, V. A., Church, P. J., & Stanley, E. F. (2002). Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications. *Ann N Y Acad Sci*, 976, 356-366.
- Blaustein, M. P., Robinson, S. W., Gottlieb, S. S., Balke, C. W., & Hamlyn, J. M. (2003). Sex, digitalis, and the sodium pump. *Mol Interv*, 3(2), 68-72, 50.
- Borges, R., Sala, F., & Garcia, A. G. (1986). Continuous monitoring of catecholamine release from perfused cat adrenals. *J Neurosci Methods*, 16(4), 289-300.
- Brewer, H. (2004). Historical perspectives on health. Early Arabic medicine. *J R Soc Promot Health*, 124(4), 184-187.
- Buck, E., Zimanyi, I., Abramson, J. J., & Pessah, I. N. (1992). Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem*, 267(33), 23560-23567.
- Camacho, M., Machado, J. D., Alvarez, J., & Borges, R. (2008). Intravesicular calcium release mediates the motion and exocytosis of secretory organelles: a study with adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem*, 283(33), 22383-22389.
- Cano-Abad, M. F., Villarroya, M., Garcia, A. G., Gabilan, N. H., & Lopez, M. G. (2001). Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. *J Biol Chem*, 276(43), 39695-39704.
- Carabelli, V., Giaccipoli, A., Baldelli, P., Carbone, E., & Artalejo, A. R. (2003). Distinct potentiation of L-type currents and secretion by cAMP in rat chromaffin cells. *Biophys J*, 85(2), 1326-1337.
- Crambert, G., Hasler, U., Beggah, A. T., Yu, C., Modyanov, N. N., Horisberger, J. D., et al. (2000). Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isoforms. *J Biol Chem*, 275(3), 1976-1986.
- Cuchillo-Ibanez, I., Olivares, R., Aldea, M., Villarroya, M., Arroyo, G., Fuentealba, J., et al. (2002). Acetylcholine and potassium elicit different patterns of exocytosis in chromaffin cells when the intracellular calcium handling is disturbed. *Pflugers Arch*, 444(1-2), 133-142.
- Cheek, T. R., Barry, V. A., Berridge, M. J., & Missiaen, L. (1991). Bovine adrenal chromaffin cells contain an inositol 1,4,5-trisphosphate-insensitive but caffeine-sensitive Ca²⁺ store that can be regulated by intraluminal free Ca²⁺. *Biochem J*, 275 (Pt 3), 697-701.
- Cheek, T. R., Moreton, R. B., Berridge, M. J., Stauderman, K. A., Murawsky, M. M., & Bootman, M. D. (1993). Quantal Ca²⁺ release from caffeine-sensitive stores in adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem*, 268(36), 27076-27083.
- Cheek, T. R., O'Sullivan, A. J., Moreton, R. B., Berridge, M. J., & Burgoyne, R. D. (1990). The caffeine-sensitive Ca²⁺ store in bovine adrenal chromaffin cells; an examination of its role in triggering secretion and Ca²⁺ homeostasis. *FEBS Lett*, 266(1-2), 91-95.
- Cheek, T. R., & Thorn, P. (2006). A constitutively active nonselective cation conductance underlies resting Ca²⁺ influx and secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium*, 40(3), 309-318.
- Chern, Y. J., Chueh, S. H., Lin, Y. J., Ho, C. M., & Kao, L. S. (1992). Presence of Na⁺/Ca²⁺ exchange activity and its role in regulation of intracellular calcium concentration in bovine adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium*, 13(2), 99-106.
- Chibalin, A. V., Ogimoto, G., Pedemonte, C. H., Pressley, T. A., Katz, A. I., Feraille, E., et al. (1999). Dopamine-induced endocytosis of Na⁺,K⁺-ATPase is initiated by

- phosphorylation of Ser-18 in the rat alpha subunit and is responsible for the decreased activity in epithelial cells. *J Biol Chem*, 274(4), 1920-1927.
- Chow, R. H., von Ruden, L., & Neher, E. (1992). Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature*, 356(6364), 60-63.
- de Diego, A. M., Arnaiz-Cot, J. J., Hernandez-Guijo, J. M., Gandia, L., & Garcia, A. G. (2008). Differential variations in Ca^{2+} entry, cytosolic Ca^{2+} and membrane capacitance upon steady or action potential depolarizing stimulation of bovine chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)*, 194(2), 97-109.
- De la Fuente, M. T., Maroto, R., Esquerro, E., Sanchez-Garcia, P., & Garcia, A. G. (1996). The actions of ouabain and lithium chloride on cytosolic Ca^{2+} in single chromaffin cells. *Eur J Pharmacol*, 306(1-3), 219-226.
- de Pascual, R., & Garcia, A. G. (2007). Ouabain augments and maintains the catecholamine release responses evoked by repetitive pulses of potassium, caffeine or histamine in perfused bovine chromaffin cells. *Eur J Pharmacol*, 568(1-3), 99-105.
- Dinkelacker, V., Voets, T., Neher, E., & Moser, T. (2000). The readily releasable pool of vesicles in chromaffin cells is replenished in a temperature-dependent manner and transiently overfills at 37 degrees C. *J Neurosci*, 20(22), 8377-8383.
- Douglas, W. W. (1968). Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol*, 34(3), 451-474.
- Douglas, W. W., & Poisner, A. M. (1961). Stimulation of uptake of calcium-45 in the adrenal gland by acetylcholine. *Nature*, 192, 1299.
- Egea, J., Rosa, A. O., Sobrado, M., Gandia, L., Lopez, M. G., & Garcia, A. G. (2007). Neuroprotection afforded by nicotine against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is lost in alpha7 nicotinic receptor knockout mice. *Neuroscience*, 145(3), 866-872.
- el-Masri, M. A., Clark, B. J., Qazzaz, H. M., & Valdes, R., Jr. (2002). Human adrenal cells in culture produce both ouabain-like and dihydroouabain-like factors. *Clin Chem*, 48(10), 1720-1730.
- Elmqvist, D., & Feldman, D. S. (1965). Effects of sodium pump inhibitors on spontaneous acetylcholine release at the neuromuscular junction. *J Physiol*, 181(3), 498-505.
- Esquerro, E., Garcia, A. G., Hernandez, M., Kirpekar, S. M., & Prat, J. C. (1980). Catecholamine secretory response to calcium reintroduction in the perfused cat adrenal gland treated with ouabain. *Biochem Pharmacol*, 29(19), 2669-2673.
- Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*, 245(1), C1-14.
- Feldberg, W., & Gaddum, J. H. (1934). The chemical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion. *J Physiol*, 81(3), 305-319.
- Fenwick, E. M., Marty, A., & Neher, E. (1982). Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol*, 331, 599-635.
- Ferrandi, M., Minotti, E., Salardi, S., Florio, M., Bianchi, G., & Ferrari, P. (1993). Characteristics of a ouabain-like factor from Milan hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 22 Suppl 2, S75-78.

- Ferrari, P., Ferrandi, M., Valentini, G., & Bianchi, G. (2006). Rostafuroxin: an ouabain antagonist that corrects renal and vascular Na⁺-K⁺-ATPase alterations in ouabain and adducin-dependent hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290(3), R529-535.
- Fill, M., & Copello, J. A. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev*, 82(4), 893-922.
- Fishman, M. C. (1979). Endogenous digitalis-like activity in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4661-4663.
- Fomina, A. F., & Nowycky, M. C. (1999). A current activated on depletion of intracellular Ca²⁺ stores can regulate exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci*, 19(10), 3711-3722.
- Fox, A. P., Nowycky, M. C., & Tsien, R. W. (1987). Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J Physiol*, 394, 149-172.
- Fujino, M., & Fujino, S. (1995). An immunohistochemical study of the significance of a new 31.5-kD ouabain receptor protein isolated from cat cardiac muscle. *Jpn J Pharmacol*, 67(2), 125-135.
- Fujioka, Y., Matsuoka, S., Ban, T., & Noma, A. (1998). Interaction of the Na⁺-K⁺ pump and Na⁺-Ca²⁺ exchange via [Na⁺]_i in a restricted space of guinea-pig ventricular cells. *J Physiol*, 509 (Pt 2), 457-470.
- Garcia, A. G., Garcia-De-Diego, A. M., Gandia, L., Borges, R., & Garcia-Sancho, J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev*, 86(4), 1093-1131.
- Garcia, A. G., Garcia-Lopez, E., Horga, J. F., Kirpekar, S. M., Montiel, C., & Sanchez-Garcia, P. (1981). Potentiation of K⁺-evoked catecholamine release in the cat adrenal gland treated with ouabain. *Br J Pharmacol*, 74(3), 673-680.
- Garcia, A. G., Garcia-Lopez, E., Montiel, C., Nicolas, G. P., & Sanchez-Garcia, P. (1981). Correlation between catecholamine release and sodium pump inhibition in the perfused adrenal gland of the cat. *Br J Pharmacol*, 74(3), 665-672.
- Garcia, A. G., Hernandez, M., Horga, J. F., & Sanchez-Garcia, P. (1980). On the release of catecholamines and dopamine-beta-hydroxylase evoked by ouabain in the perfused cat adrenal gland. *Br J Pharmacol*, 68(3), 571-583.
- Garcia, A. G., & Kirpekar, S. M. (1973). Release of noradrenaline from slices of cat spleen by pre-treatment with calcium, strontium and barium. *J Physiol*, 235(3), 693-713.
- Garcia, A. G., & Kirpekar, S. M. (1973). Release of noradrenaline from the cat spleen by sodium deprivation. *Br J Pharmacol*, 47(4), 729-747.
- Garcia, A. G., Sala, F., Reig, J. A., Viniegra, S., Frias, J., Fonteriz, R., et al. (1984). Dihydropyridine BAY-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature*, 309(5963), 69-71.
- Gil, A., Viniegra, S., & Gutierrez, L. M. (2001). Temperature and PMA affect different phases of exocytosis in bovine chromaffin cells. *Eur J Neurosci*, 13(7), 1380-1386.
- Gillis, K. D., Mossner, R., & Neher, E. (1996). Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules. *Neuron*, 16(6), 1209-1220.

- Gloor, S., Antonicek, H., Sweadner, K. J., Pagliusi, S., Frank, R., Moos, M., et al. (1990). The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the beta subunit of the Na,K-ATPase. *J Cell Biol*, 110(1), 165-174.
- Goldstein, I., Levy, T., Galili, D., Ovadia, H., Yirmiya, R., Rosen, H., et al. (2006). Involvement of Na(+), K(+)-ATPase and endogenous digitalis-like compounds in depressive disorders. *Biol Psychiatry*, 60(5), 491-499.
- Golovina, V., Song, H., James, P., Lingrel, J., & Blaustein, M. (2003). Regulation of Ca²⁺ signaling by Na⁺ pump alpha-2 subunit expression. *Ann N Y Acad Sci*, 986, 509-513.
- Golovina, V. A., & Blaustein, M. P. (1997). Spatially and functionally distinct Ca²⁺ stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum. *Science*, 275(5306), 1643-1648.
- Grupp, I., Im, W. B., Lee, C. O., Lee, S. W., Pecker, M. S., & Schwartz, A. (1985). Relation of sodium pump inhibition to positive inotropy at low concentrations of ouabain in rat heart muscle. *J Physiol*, 360, 149-160.
- Haass, M., Serf, C., Gerber, S. H., Kruger, C., Haunstetter, A., Vahl, C. F., et al. (1997). Dual effect of digitalis glycosides on norepinephrine release from human atrial tissue and bovine adrenal chromaffin cells: differential dependence on [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i. *J Mol Cell Cardiol*, 29(6), 1615-1627.
- Hansen, O. (2003). No evidence for a role in signal-transduction of Na⁺/K⁺-ATPase interaction with putative endogenous ouabain. *Eur J Biochem*, 270(9), 1916-1919.
- Herbert, J. M., Augereau, J. M., Gleye, J., & Maffrand, J. P. (1990). Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun*, 172(3), 993-999.
- Hirota, S., Pertens, E., & Janssen, L. J. (2007). The reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger provides a source of Ca²⁺ for store refilling following agonist-induced Ca²⁺ mobilization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 292(2), L438-447.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., & Katz, B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol*, 116(4), 424-448.
- Hodgkin, A. L., & Keynes, R. D. (1955). Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo. *J Physiol*, 128(1), 28-60.
- Houchi, H., Yoshizumi, M., Minakuchi, K., Ishimura, Y., Morita, K., Tamaki, T., et al. (1997). Potentiation of histamine-induced catecholamine secretion by ouabain in cultured bovine adrenal chromaffin cells is dependent on calcium and sodium influx. *Life Sci*, 60(23), 2051-2058.
- Huang, J., Hove-Madsen, L., & Tibbits, G. F. (2007). SR Ca²⁺ refilling upon depletion and SR Ca²⁺ uptake rates during development in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293(6), C1906-1915.
- Hurtado, C., Prociuk, M., Maddaford, T. G., Dibrov, E., Mesaali, N., Hryshko, L. V., et al. (2006). Cells expressing unique Na⁺/Ca²⁺ exchange (NCX1) splice variants exhibit different susceptibilities to Ca²⁺ overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290(5), H2155-2162.
- Inagami, T., & Tamura, M. (1988). Purification and characterization of specific endogenous ouabainlike substance from bovine adrenal. *Am J Med Sci*, 295(4), 400-405.
- Inoue, M., Sakamoto, Y., Fujishiro, N., Imanaga, I., Ozaki, S., Prestwich, G. D., et al. (2003). Homogeneous Ca²⁺ stores in rat adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium*, 33(1), 19-26.
- Jones, S. W. (1989). On the resting potential of isolated frog sympathetic neurons. *Neuron*, 3(2), 153-161.

- Juhaszova, M., & Blaustein, M. P. (1997). Na⁺ pump low and high ouabain affinity alpha subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(5), 1800-1805.
- Kawamura, A., Guo, J., Itagaki, Y., Bell, C., Wang, Y., Hauptert, G. T., Jr., et al. (1999). On the structure of endogenous ouabain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(12), 6654-6659.
- Kawamura, M., & Noguchi, S. (1991). Possible role of the beta-subunit in the expression of the sodium pump. *Soc Gen Physiol Ser*, 46, 45-61.
- Kennedy, D. J., Vetteth, S., Xie, M., Periyasamy, S. M., Xie, Z., Han, C., et al. (2006). Ouabain decreases sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase activity in rat hearts by a process involving protein oxidation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(6), H3003-3011.
- Kolbel, F., & Schreiber, V. (1996). The endogenous digitalis-like factor. *Mol Cell Biochem*, 160-161, 111-115.
- Kotova, O., Al-Khalili, L., Talia, S., Hooke, C., Fedorova, O. V., Bagrov, A. Y., et al. (2006). Cardiotonic steroids stimulate glycogen synthesis in human skeletal muscle cells via a Src- and ERK1/2-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 281(29), 20085-20094.
- Lamas, J. A., Reboreda, A., & Codesido, V. (2002). Ionic basis of the resting membrane potential in cultured rat sympathetic neurons. *Neuroreport*, 13(5), 585-591.
- Langer, G. A., & Serena, S. D. (1970). Effects of strophanthidin upon contraction and ionic exchange in rabbit ventricular myocardium: relation to control of active state. *J Mol Cell Cardiol*, 1(1), 65-90.
- Lara, B., Lopez, M. G., Villarroya, M., Gandia, L., Cleeman, L., Morad, M., et al. (1997). A caffeine-sensitive Ca²⁺ store modulates K⁺-evoked secretion in chromaffin cells. *Am J Physiol*, 272(4 Pt 1), C1211-1221.
- Laredo, J., Hamilton, B. P., & Hamlyn, J. M. (1994). Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. *Endocrinology*, 135(2), 794-797.
- Lemos, V. S., Poburko, D., Liao, C. H., Cole, W. C., & van Breemen, C. (2007). Na⁺ entry via TRPC6 causes Ca²⁺ entry via NCX reversal in ATP stimulated smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 352(1), 130-134.
- Levitan, E. S. (2008). Signaling for vesicle mobilization and synaptic plasticity. *Mol Neurobiol*, 37(1), 39-43.
- Li, S., Eim, C., Kirch, U., Lang, R. E., & Schoner, W. (1998). Bovine adrenals and hypothalamus are a major source of proscillaridin A- and ouabain-immunoreactivities. *Life Sci*, 62(11), 1023-1033.
- Lin, H., Ozaki, S., Fujishiro, N., Takeda, K., Imanaga, I., Prestwich, G. D., et al. (2005). Subunit composition and role of Na⁺,K⁺-ATPases in adrenal chromaffin cells. *J Physiol*, 564(Pt 1), 161-172.
- Lindmar, R., & Loffelholz, K. (1974). Neuronal and extraneuronal uptake and efflux of catecholamines in the isolated rabbit heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 284(1), 63-92.
- Liu, J., Kesiry, R., Periyasamy, S. M., Malhotra, D., Xie, Z., & Shapiro, J. I. (2004). Ouabain induces endocytosis of plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 cells by a clathrin-dependent mechanism. *Kidney Int*, 66(1), 227-241.

- Liu, J., Periyasamy, S. M., Gunning, W., Fedorova, O. V., Bagrov, A. Y., Malhotra, D., et al. (2002). Effects of cardiac glycosides on sodium pump expression and function in LLC-PK1 and MDCK cells. *Kidney Int*, 62(6), 2118-2125.
- Liu, J., & Shapiro, J. I. (2007). Regulation of sodium pump endocytosis by cardiotonic steroids: Molecular mechanisms and physiological implications. *Pathophysiology*, 14(3-4), 171-181.
- Liu, P. S., & Kao, L. S. (1990). Na(+)-dependent Ca²⁺ influx in bovine adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium*, 11(9), 573-579.
- Livett, B. G. (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev*, 64(4), 1103-1161.
- Lopez, M. G., Montiel, C., Herrero, C. J., Garcia-Palomero, E., Mayorgas, I., Hernandez-Guijo, J. M., et al. (1998). Unmasking the functions of the chromaffin cell alpha7 nicotinic receptor by using short pulses of acetylcholine and selective blockers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24), 14184-14189.
- Lytton, J., Westlin, M., & Hanley, M. R. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem*, 266(26), 17067-17071.
- Machado, D. J., Montesinos, M. S., & Borges, R. (2008). Good practices in single-cell amperometry. *Methods Mol Biol*, 440, 297-313.
- Marley, P. D. (2003). Mechanisms in histamine-mediated secretion from adrenal chromaffin cells. *Pharmacol Ther*, 98(1), 1-34.
- Marley, P. D., & Robotis, R. (1998). Activation of tyrosine hydroxylase by histamine in bovine chromaffin cells. *J Auton Nerv Syst*, 70(1-2), 1-9.
- Martin-Moutot, N., Leveque, C., Sato, K., Kato, R., Takahashi, M., & Seagar, M. (1995). Properties of omega conotoxin MVIIC receptors associated with alpha 1A calcium channel subunits in rat brain. *FEBS Lett*, 366(1), 21-25.
- Martín-Vasallo, P., González, L.M., C., Rodríguez, Y., Gallego, E., García, J.J. (1994). La bomba de sodio: una familia multigénica. *Nefrología*, vol.14 n°4 427-435
- Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T., & Mikoshiba, K. (1997). 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem*, 122(3), 498-505.
- McKenzie, S., & Marley, P. D. (2002). Caffeine stimulates Ca(2+) entry through store-operated channels to activate tyrosine hydroxylase in bovine chromaffin cells. *Eur J Neurosci*, 15(9), 1485-1492.
- Meissner, G. (1986). Ryanodine activation and inhibition of the Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 261(14), 6300-6306.
- Meldolesi, J., & Pozzan, T. (1998). The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci*, 23(1), 10-14.
- Merrifield, C. J., Feldman, M. E., Wan, L., & Almers, W. (2002). Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat Cell Biol*, 4(9), 691-698.
- Miyakawa-Naito, A., Uhlen, P., Lal, M., Aizman, O., Mikoshiba, K., Brismar, H., et al. (2003). Cell signaling microdomain with Na,K-ATPase and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor generates calcium oscillations. *J Biol Chem*, 278(50), 50355-50361.

- Mohammadi, K., Kometiani, P., Xie, Z., & Askari, A. (2001). Role of protein kinase C in the signal pathways that link Na⁺/K⁺-ATPase to ERK1/2. *J Biol Chem*, 276(45), 42050-42056.
- Montiel, C., Mendoza, I., Garcia, C. J., Awad, Y., Garcia-Olivares, J., Solis-Garrido, L. M., et al. (2003). Distinct protein kinases regulate SNAP-25 expression in chromaffin cells. *J Neurosci Res*, 71(3), 353-364.
- Moro, M. A., Lopez, M. G., Gandia, L., Michelena, P., & Garcia, A. G. (1990). Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal Biochem*, 185(2), 243-248.
- Neher, E. (1998). Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron*, 20(3), 389-399.
- Neher, E., & Augustine, G. J. (1992). Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J Physiol*, 450, 273-301.
- Nicholls, M. G., Lewis, L. K., Yandle, T. G., Lord, G., McKinnon, W., & Hilton, P. J. (2009). Ouabain, a circulating hormone secreted by the adrenals, is pivotal in cardiovascular disease. Fact or fantasy? *J Hypertens*, 27(1), 3-8.
- Nishio, M., Ruch, S. W., Kelly, J. E., Aistrup, G. L., Sheehan, K., & Wasserstrom, J. A. (2004). Ouabain increases sarcoplasmic reticulum calcium release in cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 308(3), 1181-1190.
- Nishio, M., Ruch, S. W., & Wasserstrom, J. A. (2002). Positive inotropic effects of ouabain in isolated cat ventricular myocytes in sodium-free conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283(5), H2045-2053.
- Nofal, S., Becherer, U., Hof, D., Matti, U., & Rettig, J. (2007). Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility. *J Neurosci*, 27(6), 1386-1395.
- Nunez, L., De La Fuente, M. T., Garcia, A. G., & Garcia-Sancho, J. (1995). Differential Ca²⁺ responses of adrenergic and noradrenergic chromaffin cells to various secretagogues. *Am J Physiol*, 269(6 Pt 1), C1540-1546.
- O'Brien, W. J., Lingrel, J. B., & Wallick, E. T. (1994). Ouabain binding kinetics of the rat alpha two and alpha three isoforms of the sodium-potassium adenosine triphosphate. *Arch Biochem Biophys*, 310(1), 32-39.
- Obukhov, A. G., & Nowycky, M. C. (2002). TRPC4 can be activated by G-protein-coupled receptors and provides sufficient Ca(2+) to trigger exocytosis in neuroendocrine cells. *J Biol Chem*, 277(18), 16172-16178.
- Olivera, B. M., Miljanich, G. P., Ramachandran, J., & Adams, M. E. (1994). Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem*, 63, 823-867.
- Orozco, C., Garcia-de-Diego, A. M., Arias, E., Hernandez-Guijo, J. M., Garcia, A. G., Villarroja, M., et al. (2006). Depolarization preconditioning produces cytoprotection against veratridine-induced chromaffin cell death. *Eur J Pharmacol*, 553(1-3), 28-38.
- Ozawa, H., & Katsuragi, T. (1974). Ouabain-induced potentiation on the contractions of the guinea-pig vas deferens. *Eur J Pharmacol*, 25(2), 147-154.
- Ozawa, Y., Houchi, H., Teraoka, K., Azuma, M., Kamimura, T., Yoshizumi, M., et al. (2000). Long-term regulation of catecholamine formation by ouabain in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 36 Suppl 2, S15-18.

- Palmer, A. E., Jin, C., Reed, J. C., & Tsien, R. Y. (2004). Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca^{2+} analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(50), 17404-17409.
- Pan, C. Y., & Fox, A. P. (2000). Rundown of secretion after depletion of intracellular calcium stores in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem*, 75(3), 1132-1139.
- Pan, C. Y., Huang, C. H., & Lee, C. H. (2006). Calcium elevation elicited by reverse mode $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity is facilitated by intracellular calcium stores in bovine chromaffin cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 342(2), 589-595.
- Pan, C. Y., & Kao, L. S. (1997). Catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells: the role of the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and the intracellular Ca^{2+} pool. *J Neurochem*, 69(3), 1085-1092.
- Paschen, W. (2003). Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. *Cell Calcium*, 34(4-5), 365-383.
- Paschen, W. (2003). Mechanisms of neuronal cell death: diverse roles of calcium in the various subcellular compartments. *Cell Calcium*, 34(4-5), 305-310.
- Paton, D. M. (1971). Evidence for an effect of sodium pumping on spontaneous contractility of rabbit detrusor muscle. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 40(3), 751-759.
- Patterson, P. H. (1990). Control of cell fate in a vertebrate neurogenic lineage. *Cell*, 62(6), 1035-1038.
- Peng, M., Huang, L., Xie, Z., Huang, W. H., & Askari, A. (1996). Partial inhibition of $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase by ouabain induces the Ca^{2+} -dependent expressions of early-response genes in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 271(17), 10372-10378.
- Perez-Alvarez, A., Hernandez-Vivanco, A., Cano-Abad, M., & Albillos, A. (2008). Pharmacological and biophysical properties of Ca^{2+} channels and subtype distributions in human adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch*, 456(6), 1149-1162.
- Pickering, J. D., White, E., Duke, A. M., & Steele, D. S. (2009). DHPR activation underlies SR Ca^{2+} release induced by osmotic stress in isolated rat skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol*, 133(5), 511-524.
- Plourde, D., & Soltoff, S. P. (2006). Ouabain potentiates the activation of ERK1/2 by carbachol in parotid gland epithelial cells; inhibition of ERK1/2 reduces Na^{+} - K^{+} -ATPase activity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290(3), C702-710.
- Plummer, M. R., Logothetis, D. E., & Hess, P. (1989). Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron*, 2(5), 1453-1463.
- Potter, T., Hauck, C., Pocas, E. S., Diedrichs, H., Adam, C., Reuter, H., et al. (2009). Inhibition of the $\alpha 1\beta 1$ isoform of the Na^{+} , K^{+} -ATPase by 8-methoxycoumestrol without positive inotropic effect in human myocardium--novel aspects of cardiac glycoside pharmacology. *J Cardiovasc Pharmacol*, 54(1), 10-15.
- Putney, J. W., Jr. (2007). Inositol lipids and TRPC channel activation. *Biochem Soc Symp*(74), 37-45.
- Rang, H.P., Dale, M.M. (2008) en *Farmacología*, 6ª Ed, Elsevier España

- Regan, L. J., Sah, D. W., & Bean, B. P. (1991). Ca^{2+} channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and omega-conotoxin. *Neuron*, 6(2), 269-280.
- Ringer, S. (1885). Regarding the influence of the Organic Constituents of the blood on the Contractility of the Ventricle. *J Physiol*, 6(6), 361-463 367.
- Robinson, I. M., Cheek, T. R., & Burgoyne, R. D. (1992). Ca^{2+} influx induced by the Ca^{2+} -ATPase inhibitors 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone and thapsigargin in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem J*, 288 (Pt 2), 457-463.
- Rodrigues-Mascarenhas, S., Da Silva de Oliveira, A., Amoedo, N. D., Affonso-Mitidieri, O. R., Rumjanek, F. D., & Rumjanek, V. M. (2009). Modulation of the immune system by ouabain. *Ann N Y Acad Sci*, 1153, 153-163.
- Rosa, A. O., Egea, J., Gandia, L., Lopez, M. G., & Garcia, A. G. (2006). Neuroprotection by nicotine in hippocampal slices subjected to oxygen-glucose deprivation: involvement of the $\alpha 7$ nAChR subtype. *J Mol Neurosci*, 30(1-2), 61-62.
- Rousseau, E., Smith, J. S., & Meissner, G. (1987). Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca^{2+} release channel. *Am J Physiol*, 253(3 Pt 1), C364-368.
- Sagawa, T., Nishio, M., Sagawa, K., Kelly, J. E., Lokuta, A. J., Tsai, J., et al. (2001). Activation of purified cardiac ryanodine receptors by dihydropyridine agonists. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280(3), H1201-1207.
- Sagawa, T., Sagawa, K., Kelly, J. E., Tsushima, R. G., & Wasserstrom, J. A. (2002). Activation of cardiac ryanodine receptors by cardiac glycosides. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282(3), H1118-1126.
- Sarkozi, S., Szentesi, P., Jona, I., & Csernoch, L. (1996). Effects of cardiac glycosides on excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle fibres. *J Physiol*, 495 (Pt 3), 611-626.
- Sather, W. A., Tanabe, T., Zhang, J. F., Mori, Y., Adams, M. E., & Tsien, R. W. (1993). Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel $\alpha 1$ subunits. *Neuron*, 11(2), 291-303.
- Schatzmann, H. J. (1953). [Cardiac glycosides as inhibitors of active potassium and sodium transport by erythrocyte membrane.]. *Helv Physiol Pharmacol Acta*, 11(4), 346-354.
- Schneider, R., Wray, V., Nimtz, M., Lehmann, W. D., Kirch, U., Antolovic, R., et al. (1998). Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. *J Biol Chem*, 273(2), 784-792.
- Schoner, W. (2002). Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *Eur J Biochem*, 269(10), 2440-2448.
- Schoner, W. (2002). Sodium pump and steroid hormone receptor. $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase. *Eur J Biochem*, 269(10), 2423.
- Shakiryanova, D., Klose, M. K., Zhou, Y., Gu, T., Deitcher, D. L., Atwood, H. L., et al. (2007). Presynaptic ryanodine receptor-activated calmodulin kinase II increases vesicle mobility and potentiates neuropeptide release. *J Neurosci*, 27(29), 7799-7806.
- Shull, G. E., Greeb, J., & Lingrel, J. B. (1986). Molecular cloning of three distinct forms of the $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPase α -subunit from rat brain. *Biochemistry*, 25(25), 8125-8132.
- Skou, J. C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta*, 23(2), 394-401.

- Smith, C., Moser, T., Xu, T., & Neher, E. (1998). Cytosolic Ca^{2+} acts by two separate pathways to modulate the supply of release-competent vesicles in chromaffin cells. *Neuron*, 20(6), 1243-1253.
- Sorimachi, M., Yamagami, K., Nishimura, S., & Kuramoto, K. (1992). Possible regulation of caffeine-induced intracellular Ca^{2+} mobilization by intracellular free Na^{+} . *J Neurochem*, 59(6), 2271-2277.
- Steyer, J. A., & Almers, W. (1999). Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophys J*, 76(4), 2262-2271.
- Steyer, J. A., & Almers, W. (2001). A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(4), 268-275.
- Steyer, J. A., Horstmann, H., & Almers, W. (1997). Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature*, 388(6641), 474-478.
- Szent-Gyorgyi, A. (1953) *Chemical Physiology of Contraction in Body and Heart Muscle*. New York: Academic Press, 86–91
- Tamura, M., Landon, E. J., & Inagami, T. (1998). Na^{+} , K^{+} -ATPase inhibitors in rat urine: origins and physiological significance. *Clin Exp Hypertens*, 20(5-6), 543-550.
- Tanaka, H., Shimada, H., Namekata, I., Kawanishi, T., Iida-Tanaka, N., & Shigenobu, K. (2007). Involvement of the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in ouabain-induced inotropy and arrhythmogenesis in guinea-pig myocardium as revealed by SEA0400. *J Pharmacol Sci*, 103(2), 241-246.
- Tapia, L., Garcia-Eguiagaray, J., Garcia, A. G., & Gandia, L. (2009). Preconditioning stimuli that augment chromaffin cell secretion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296(4), C792-800.
- Taraska, J. W., Perrais, D., Ohara-Imaizumi, M., Nagamatsu, S., & Almers, W. (2003). Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4), 2070-2075.
- Tesfai, Y., Brereton, H. M., & Barritt, G. J. (2001). A diacylglycerol-activated Ca^{2+} channel in PC12 cells (an adrenal chromaffin cell line) correlates with expression of the TRP-6 (transient receptor potential) protein. *Biochem J*, 358(Pt 3), 717-726.
- Thrower, E. C., Lea, E. J., & Dawson, A. P. (1998). The effects of free $[\text{Ca}^{2+}]$ on the cytosolic face of the inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor at the single channel level. *Biochem J*, 330 (Pt 1), 559-564.
- Tian, J., Cai, T., Yuan, Z., Wang, H., Liu, L., Haas, M., et al. (2006). Binding of Src to $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase forms a functional signaling complex. *Mol Biol Cell*, 17(1), 317-326.
- Torok, T. L., & Powis, D. A. (1990). Catecholamine release from bovine chromaffin cells: the role of sodium-calcium exchange in ouabain-evoked release. *Exp Physiol*, 75(4), 573-586.
- Verkhatsky, A. (2004). Endoplasmic reticulum calcium signaling in nerve cells. *Biol Res*, 37(4), 693-699.
- Villarroya, M., Olivares, R., Ruiz, A., Cano-Abad, M. F., de Pascual, R., Lomax, R. B., et al. (1999). Voltage inactivation of Ca^{2+} entry and secretion associated with N- and P/Q-type but not L-type Ca^{2+} channels of bovine chromaffin cells. *J Physiol*, 516 (Pt 2), 421-432.
- Vizi, E. S. (1972). Stimulation, by inhibition of $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+} + \text{Mg}^{2+})$ -activated ATP-ase, of acetylcholine release in cortical slices from rat brain. *J Physiol*, 226(1), 95-117.

- von Ruden, L., & Neher, E. (1993). A Ca-dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Science*, 262(5136), 1061-1065.
- Wakade, A. R. (1981). Facilitation of secretion of catecholamines from rat and guinea-pig adrenal glands in potassium-free medium or after ouabain. *J Physiol*, 313, 481-498.
- Wang, M., Chen, Z., Xing, Y., Zhang, X., Dong, X. Z., & Ji, G. J. (2006). Localized Ca²⁺ uncaging induces Ca²⁺ release through IP3R in smooth muscle. *Acta Pharmacol Sin*, 27(7), 939-944.
- Wang, X. Q., & Yu, S. P. (2005). Novel regulation of Na, K-ATPase by Src tyrosine kinases in cortical neurons. *J Neurochem*, 93(6), 1515-1523.
- Wasserstrom, J. A., & Aistrup, G. L. (2005). Digitalis: new actions for an old drug. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(5), H1781-1793.
- Wightman, R. M., Jankowski, J. A., Kennedy, R. T., Kawagoe, K. T., Schroeder, T. J., Leszczyszyn, D. J., et al. (1991). Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(23), 10754-10758.
- Withering, W. (1785). An account of the foxglove and some of its medical uses: with practical remarks on dropsy and other diseases. London. Ed. J and J Robinson
- Wu, M. P., Kao, L. S., Liao, H. T., & Pan, C. Y. (2008). Reverse mode Na⁺/Ca²⁺ exchangers trigger the release of Ca²⁺ from intracellular Ca²⁺ stores in cultured rat embryonic cortical neurons. *Brain Res*, 1201, 41-51.
- Wurtman, R. J., & Axelrod, J. (1965). Adrenaline synthesis: control by the pituitary gland and adrenal glucocorticoids. *Science*, 150(702), 1464-1465.
- Yang, D. M., & Kao, L. S. (2001). Relative contribution of the Na(+)/Ca(2+) exchanger, mitochondria and endoplasmic reticulum in the regulation of cytosolic Ca(2+) and catecholamine secretion of bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem*, 76(1), 210-216.
- Yang, Y., Udayasankar, S., Dunning, J., Chen, P., & Gillis, K. D. (2002). A highly Ca²⁺-sensitive pool of vesicles is regulated by protein kinase C in adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(26), 17060-17065.
- Yuan, Z., Cai, T., Tian, J., Ivanov, A. V., Giovannucci, D. R., & Xie, Z. (2005). Na/K-ATPase tethers phospholipase C and IP3 receptor into a calcium-regulatory complex. *Mol Biol Cell*, 16(9), 4034-4045.
- Zerbes, M., Clark, C. L., & Powis, D. A. (2001). Neurotransmitter release from bovine adrenal chromaffin cells is modulated by capacitative Ca(2+)entry driven by depleted internal Ca(2+)stores. *Cell Calcium*, 29(1), 49-58.
- Zhang, E., Xue, R., Soo, J., & Chen, P. (2008). Effects of phorbol ester on vesicle dynamics as revealed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Pflugers Arch*, 457(1), 211-222.
- Zucchi, R., & Ronca-Testoni, S. (1997). The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev*, 49(1), 1-51.